

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук



*На правах рукописи*

**Мальцев Евгений Иванович**

**Филогения, систематика и биотехнологический потенциал микроводорослей и  
цианобактерий из разнотипных экосистем Евразии**

1.5.6. Биотехнология  
1.5.9. Ботаника

**Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук  
в виде научного доклада**

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

**Научный консультант:**

**Куликовский Максим Сергеевич**

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится 30 марта 2023 г. в 11<sup>00</sup> на заседании Диссертационного совета 24.1.232.02 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пушкино, проспект науки, д. 5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» и на сайте <https://www.pbcras.ru/>

Диссертация в виде научного доклада разослана «27» декабря 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.232.02  
кандидат биологических наук



Ветрова Анна Андрияновна

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b>	<b>4</b>
<b>Основное содержание работы</b>	<b>12</b>
<b>Глава 1. Систематика и описание новых для науки таксонов микроводорослей и цианобактерий и проблема криптических видов</b>	<b>12</b>
<b>Глава 2. Молекулярная филогения отдельных таксонов микроводорослей и цианобактерий и соотношение с морфологическими признаками</b>	<b>20</b>
<b>Глава 3. Изучение состава жирных кислот, пигментов микроводорослей, цианобактерий и факторов, влияющих на их содержание</b>	<b>27</b>
3.1. Скрининг состава жирных кислот в биомассе микроводорослей и цианобактерий	27
3.2. Влияние интенсивности освещения и спектрального состава на накопление жирных кислот и пигментов	37
3.3. Скрининг состава пигментов в биомассе микроводорослей и цианобактерий	38
<b>Глава 4. Влияние потенциально токсичных элементов на микроводоросли</b>	<b>41</b>
<b>Глава 5. Микроводоросли промышленных отвалов, почв урбоэкосистем и возможность биотехнологического использования организмов</b>	<b>43</b>
5.1. Микроводоросли и цианобактерии промышленных отвалов	44
5.2. Микроводоросли и цианобактерии урбоэкосистем	47
<b>Заключение</b>	<b>49</b>
<b>Список литературы</b>	<b>51</b>
<b>Список научных публикаций, в которых изложены основные научные результаты диссертации</b>	<b>58</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и степень разработанности темы**

Микроводоросли и цианобактерии – разнообразная группа фотосинтезирующих организмов, которые населяют различные водные и наземные местообитания. Они обеспечивают создание первичной продукции и вступают в сложные взаимодействия с другими живыми организмами (Weber et al., 2016). Изучению микроводорослей и цианобактерий уделяется большое внимание, что связано как с их огромным значением на различных этапах развития и функционирования экосистем, так и с возможностью использования во многих сферах деятельности человека. Микроводоросли и цианобактерии широко используют при оценке биоресурсного потенциала водных экосистем, уровня эвтрофикации и антропогенного загрязнения, возможности биологической рекультивации техногенных экотопов, в биотехнологических производствах (Borowitzka, 2013; Figueroa-Torres et al., 2019; Li-Beissona et al., 2019; Expósito et al., 2021; Zada et al., 2022).

При изучении микроводорослей и цианобактерий все большее значение придается их точной видовой идентификации, которая обеспечивается использованием интегративного подхода и современных методов исследования (Komárek et al., 2014). В последнее время большое количество работ посвящено изучению разнообразия микроводорослей и цианобактерий, в том числе криптических видов, уточнению и ревизии различных таксономических групп, установлению структурно-функциональной роли организмов в экосистемах, их взаимодействий с другими живыми объектами в сообществах, в том числе, на первых этапах сингенеза (Gypser et al., 2016; Patova et al., 2016; Marques et al., 2017; Nyenda et al., 2019), оценке биоиндикационного и диагностического потенциала микроводорослей (Nyenda et al., 2019; Salama et al., 2019; Sultana, 2020), чувствительности микроводорослей к действию токсических элементов, возможностей осуществления ремедиации и т.п.

Вопрос изучения видового богатства микроводорослей, цианобактерий и устранения таксономических проблем еще далек от решения. С одной стороны, это связано со сложностями разграничения видов, характеризующихся большим морфологическим сходством, без привлечения молекулярно-филогенетических данных; с другой – с недостаточным охватом исследованиями всего разнообразия существующих местообитаний. Для исследования видового богатства микроводорослей и цианобактерий особую ценность представляют регионы и территории с уникальными малоизученными экосистемами как природного, так и искусственного происхождения. Это, прежде всего, экосистемы Восточной Сибири России, в том числе и озеро Байкал, тропические экосистемы Индии, Индонезии, Вьетнама, экосистемы Монголии, Китая, искусственные и природные лесные экосистемы крайнего юга Украины, за пределами территорий так называемого экологического соответствия (Бельгард, 1971), экосистемы урбанизированных и техногенного нарушенных территорий. Разнообразие данных экосистем и соответствующий им широкий диапазон экологических условий, создает хорошие перспективы для обнаружения новых видов и штаммов микроводорослей и цианобактерий, интересных как с флористико-экологической, так и с точки зрения решения задач экологического мониторинга, ремедиации, а также для осуществления биотехнологических производств.

Многие микроводоросли и цианобактерии привлекают внимание своей способностью накапливать ценные с биотехнологической точки зрения соединения

(Barkia et al., 2019; Figueroa-Torres et al., 2019; Sathasivam et al., 2019; Levasseur et al., 2020; Lever et al., 2020). Биотехнологическая ценность микроводорослей кроме широкого спектра соединений, которые они синтезируют, обуславливается быстротой роста, возможностью повышать синтез целевых биопродуктов при изменении условий культивирования (Sun et al., 2018; Li-Beissona et al., 2019; Levasseur et al., 2020). На данный момент в мире наблюдается стойкая динамика увеличения спроса на биомассу микроводорослей, что стимулирует работы в этом направлении (Maltsev et al., 2017; A1). Сдерживающим фактором массового промышленного выращивания биомассы микроводорослей считаются более высокие затраты её получения по сравнению с сырьем иного происхождения. Поэтому важным направлением является продолжение работ по повышению продуктивности уже известных или поиск и выделение новых высокопродуктивных штаммов микроводорослей и цианобактерий, которые будут характеризоваться лучшими темпами накопления биомассы, более высоким содержанием ценных биопродуктов и их оптимальными пропорциями по сравнению с уже известными.

Таким образом, несмотря на значительные успехи в изучении и практическом применении микроводорослей и цианобактерий, многие вопросы, касающиеся их видового разнообразия, таксономической принадлежности, филогенетических связей, биогеографии, экологии, биохимии, биотехнологической ценности требуют проведения современных исследований.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы – изучение новых для науки таксонов микроводорослей и цианобактерий, выделение и биохимическая характеристика штаммов-продуцентов для их биотехнологического использования.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Изучение систематики и морфологии отдельных таксонов микроводорослей и цианобактерий с анализом криптического разнообразия из различных экосистем Евразии: почвенных и водных экосистем России, Бельгии, Вьетнама, Индии, Индонезии, Китая, Монголии и Украины.

2. Изучение молекулярной филогении отдельных таксонов микроводорослей и цианобактерий с анализом соотношения молекулярных и морфологических данных; выделение диакритических признаков в разных группах микроводорослей и цианобактерий.

3. Анализ молекулярных критериев таксономической идентификации цианобактерий и возможности создания матрицы процентного сходства на основании спиралей ITS D1–D1', *Vox–V* и *V3* для расчета *p*-расстояния.

4. Выделение в культуру новых и уникальных видов и штаммов микроводорослей и цианобактерий для пополнения коллекции культур организмов, генетического банка данных (включая последовательности для штрихкодирования) и создания референсных баз данных для биотехнологического использования организмов.

5. Изучение биохимического состава штаммов микроводорослей – возможных объектов биотехнологических производств липидов, жирных кислот, пигментов (*В-фикоэритрина* и *фукоксантина*).

6. Оценка влияния стрессовых факторов (изменений светового режима и состава минерального питания) на накопление липидов и жирных кислот для отдельных представителей микроводорослей и цианобактерий.

7. Изучение влияния на микроводоросли некоторых химических элементов, рассматриваемых в том числе как токсичные.

8. Изучение влияния экологических особенностей техногенных и урбанизированных местообитаний на сообщества микроводорослей и цианобактерий как основы их дальнейшего биотехнологического использования.

### **Научная новизна**

Впервые было проведено комплексное исследование разнообразия микроводорослей и цианобактерий из экосистем различных регионов Евразии с анализом их молекулярно-филогенетических, морфологических, экологических и биохимических особенностей. В природных образцах, отобранных в различных почвенных и водных экосистемах России, Бельгии, Вьетнама, Индии, Индонезии, Китая, Монголии и Украины было обнаружено, выделено и изучено 128 штаммов микроводорослей и цианобактерий из классов Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Synurophyceae, Porphyridiophyceae и Cyanophyceae. Изученные штаммы стали основой для создания коллекции культур водорослей и цианобактерий биотехнологического назначения.

В результате детального изучения микроводорослей и цианобактерий с помощью интегративного подхода, включая особенности морфологии и ультраструктуры, экологические, биохимические и молекулярно-филогенетические характеристики было описано 2 новых рода и 34 новых вида из Bacillariophyceae, 1 новый вид из Chlorophyceae, 1 – из Trebouxiophyceae, 3 – из Cyanophyceae. Изучено филогенетическое положение 9 родов и одного семейства из Bacillariophyceae. В результате проведенных исследований для ряда видов микроводорослей было осуществлено уточнение диагностических признаков, филогенетического и таксономического положения, предложено 23 новых таксономических комбинации. Также с помощью изучения морфологии и молекулярно-генетических особенностей был подтвержден таксономический статус 18 известных видов из Bacillariophyceae, 5 – из Chlorophyceae, 1 – из Trebouxiophyceae, 1 – из Cyanophyceae. В целом это позволило установить новые места распространения 73 видов микроводорослей и цианобактерий или подтвердить современными методами уже известные. Для штаммов, которые, по предварительной оценке, могли иметь биотехнологическую ценность, были проведены исследования их биохимических, кинетических и продукционных характеристик. Результаты исследований позволили дополнить информацию относительно особенностей влияния стрессовых факторов (изменений светового режима и состава минерального питания) на накопление биомассы, содержание липидов и состав жирных кислот для отдельных представителей микроводорослей и цианобактерий, а также воздействия на микроводоросли некоторых токсических элементов.

### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

Материалы, полученные в ходе исследований, позволят делать новые теоретические и практические выводы по актуальным вопросам видового разнообразия микроводорослей и цианобактерий, географического распространения видов, особенностей таксономии отдельных групп микроводорослей, диакритических признаков на уровне морфологии и нуклеотидных последовательностей, предсказания вторичного строения D1–D1', Vох–B, V3 и ITS2; приблизиться к целостному пониманию закономерностей формирования видового и биохимического разнообразия микроводорослей и цианобактерий, и соответственно, их экосистемной роли,

трофических взаимодействий; разрабатывать программы мониторинга и механизмы улучшения качественного состава биохимических компонентов биомассы водорослей; устанавливать особенности адаптивного отклика состава биомассы микроводорослей и цианобактерий на специфические условия культивирования, а также осуществлять поиск биотехнологически ценных штаммов и выделять их в культуру. Полученные результаты используются в Мурманском государственном техническом университете по дисциплинам и практикам:

«Методы биоинформатики в молекулярной биологии» и «Практика по профилю профессиональной деятельности» для студентов магистерской программы 06.04.01 Биология направленности «Молекулярная биология и биотехнология»; «Учебно-исследовательская работа» и «Научно-исследовательская работа» по направлению подготовки 06.04.01 Биология, направленностей «Молекулярная биология и биотехнология» и «Микробиология и биохимия». Основные положения диссертационного исследования используются в Мелитопольском государственном университете при подготовке студентов бакалаврских программ 44.03.01 Педагогическое образование направленности «Биология» и 06.03.01 Биология направленности «Биология и биомедицина» во время чтения дисциплины «Биотехнология с основами генетической инженерии с учебной практикой»; при подготовке кадров высшей квалификации программы 06.06.01 Биологические науки во время чтения дисциплины «Биотехнология микроводорослей».

### **Материалы и методы исследований**

Результаты исследований основаны на материалах, собранных в наземных и водных экосистемах природного и искусственного происхождения в различных регионах России, Индии и Украины. Также совместно с коллегами из Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН были изучены природные образцы, отобранные ими во Вьетнаме, Индонезии и Монголии, а также переданные для совместного изучения коллекционные штаммы из Гентского университета (Бельгия), Ботанического сада и ботанического музея Берлин-Далем Свободного университета Берлина (Германия).

Сбор почвенного материала проводился в соответствии с общепринятой методикой (Голлербах, Штина, 1969). Отбор проб планктона осуществляли при помощи планктонной сети Апштейна. Пробы фитобентоса и поверхностных донных осадков отбирали стеклянной трубкой. Для сбора обрастателей делали соскобы, смывы и выжимки различных субстратов. Собранный материал использовался для изучения микроводорослей и цианобактерий прямым микроскопированием, для постановки различных культур (агаровых накопительных, водных, почвенных со стеклами обрастания) и приготовления временных и постоянных микропрепаратов. С помощью инвертированного светового микроскопа Zeiss Axio Vert. A1 из культур микробиопетированием выделялись штаммы микроводорослей и цианобактерий. В культурах для поддержания роста микроводорослей и цианобактерий использовались различные питательные среды. Штаммы зеленых водорослей поддерживались на стандартной среде BBM (Bischoff, Bold, 1963), а также проводились манипуляции с концентрацией нитратов и фосфатов в ней. Культуры морских диатомовых и красных водорослей выращивали на модифицированной среде ESAW (Полякова и др., 2018). Культуры пресноводных и почвенных диатомовых водорослей поддерживали на среде WC (Guillar, Lorenzen, 1972). Штаммы гетероцитных цианобактерий – на модифицированной среде Z8 (Kotai, 1972) без нитратов. Помимо перечисленных

использовалась питательная среда Waris-H+Si (McFadden, Melkonian, 1986) для диатомовых водорослей, питательная среда для морских красных водорослей по Тренкеншу (Тренкеншу и др., 1981), а также BG-11 (Rippka et al., 1979) и её вариации с разной концентрацией фосфатов и нитратов для зеленых водорослей. Культуры микроводорослей и цианобактерий выращивали в колбах объемом 250 и 500 мл на орбитальных шейкерах (A32; A29; A26; A18; A14; A6; A5), в лабораторном шейкере-инкубаторе Multitron (A37; A35; A34), а также в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа размером 5×25×50 см, с рабочей толщиной 5 см и объёмом 3 л (Gudvilovich et al., 2021; A3).

Интегративный подход был применен для идентификации микроводорослей и цианобактерий. Изучение морфологии и жизненных циклов проводилось с использованием светового микроскопа Zeiss Axio Scope A1 и электронного сканирующего микроскопа JSM-6510LV. Молекулярно-филогенетические методы предполагали подбор праймеров или их конструирование, выделение ДНК, проведение ПЦР, визуализацию и очистку ПЦР-продуктов в лаборатории молекулярной систематики водных растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН; секвенирование ПЦР-продуктов на коммерческой основе в научно-производственной компании СИНТОЛ и ЗАО Евроген; обработку данных с использованием различных биоинформационных программ (BEAST, BioEdit, jmodeltest, MEGA, MrBayes, PseudoViewer, RAxML, Tracer). Основу молекулярно-филогенетических исследований составили нуклеотидные последовательности генов 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, *rbcL*, *mcy*, *nda*, регионов ITS1–5, 8S rDNA–ITS2 и 16S–23S ITS. Построение филогенетических деревьев проводили методами максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI). Предсказание вторичной структуры ITS2 у зеленых микроводорослей и шпилек D1–D1', Vох–V и V3 у цианобактерий осуществляли с помощью программного обеспечения Mfold после определения границ спиралей и шпилек. Всего с использованием методов молекулярно-филогенетических исследований и при использовании световой и электронной микроскопии было исследовано 128 штаммов: диатомовых водорослей – 110, зеленых – 12, золотистых – 1, красных – 1 и цианобактерий – 4. Было получено 228 нуклеотидных последовательностей, депонированных в базу данных NCBI.

При работе со штаммами коллекции культур водорослей и цианобактерий биотехнологического использования изучали их биохимические характеристики. Определение содержания липидов проводили по методу Bligh, Dyer (1959). Изучение состава и содержания жирных кислот осуществляли экстрагированием метиловых эфиров жирных кислот с помощью *n*-гексана и последующим анализом на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975C (A32; A14; A6; A5). Содержание фукоксантина анализировали экстракцией растворами хлороформ-метанол, 96%-ный этанол и ацетонитрил с дальнейшим анализом на сверхвысокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera X2 (A38). Количественное содержание В-фикоэритрина определяли спектрофотометрическим методом после предварительной экстракции из биомассы фосфатным буфером (A3). Для оценки действия тяжелых металлов Zn и Mn на штаммы зеленых микроводорослей из родов *Bracteacoccus* Tereg и *Lobosphaera* Reisingl проводили лабораторные эксперименты с различными концентрациями металлов в питательной среде BBM: 1, 5, 25, 50, 500 и 1000 мг/л (A16).

Все результаты были обработаны с применением классических статистических методов, в том числе, методов дисперсионного анализа, главных компонент и др. Для

этого использовались различные пакеты прикладных компьютерных программ (A21; A16; A11; A6; A5).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Совместный анализ морфологических признаков и молекулярно-филогенетических данных позволил описать новые таксоны, значительно пересмотреть таксономическое положение и систематику родов микроводорослей и установить наличие криптического разнообразия среди космополитичных организмов.

2. Включение в анализ новых для науки видов и изучение уникальных штаммов из разнотипных экосистем позволило значительно расширить линейку уникальных продуцентов жирных кислот и пигментов, существенно нарастить информацию по ваучерам и расширить референсные базы данных.

3. Из известных на данное время 135 жирных кислот, продуцируемых микроводорослями и цианобактериями, треть (41) представлена ценными для практического использования омега-3 и омега-6 кислотами, в то же время профиль жирных кислот микроводорослей связан не с видовыми особенностями таксонов, а со спецификой конкретного штамма, сформировавшейся под влиянием определенных экологических условий, технологией культивирования и способом стрессирования.

4. На состав и развитие сообществ микроводорослей и цианобактерий промышленных отвалов в первую очередь влияет рН и содержание частиц физической глины в субстрате, в меньшей степени – минералогический состав, засоление и количество гумуса, при этом потенциальные продуценты полиненасыщенных жирных кислот были зафиксированы на стадии слоистого эпилитофитона первичного этапа сукцессии.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов основывается на детально спланированной программе проведения исследований, использовании современных лабораторных методов и соответствующих методов обработки информации и статистического анализа. Положения и результаты диссертации опубликованы в научных статьях в журналах первого и второго квартилей по базам данных Scopus и Web of Science, проходили рецензирование независимыми международными экспертами. Результаты апробировались на всероссийских и международных конференциях в виде пленарных и секционных докладов.

### **Апробация результатов работы**

Результаты, представленные в диссертации, докладывались автором и обсуждались на международных и всероссийских конференциях, включая I Всеукраинскую конференцию с международным участием «Биология и экология почв» (Львов, Украина, 2015); XIV Международную научную конференцию диатомологов «Диатомовые водоросли: успехи, проблемы и перспективы исследований» (Звенигород, Россия, 2015); III (XI) Международную ботаническую конференцию молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, Россия, 2015); 9th International Chrysophyte Symposium (Ямагата, Япония, 2016); 11th International Phycological Congress (Щецин, Польша, 2017); International Conference of Young Scientists «Advances in botany and ecology» (Луцк, Украина, 2017); XV Международную научную конференцию альгологов (XV Диатомовая школа) «Диатомовые водоросли: современное состояние и перспективы исследований» (Борок, Ярославская обл.,

Россия, 2017); International forum biotechnology «State of the art and perspectives» (Москва, Россия, 2018); II Международную научную конференцию «Экологические исследования лесных биогеоценозов степной зоны Украины» (Днепропетровск, Украина, 2018); Всероссийскую конференцию с международным участием «Микология и альгология России. XX-XXI век: смена парадигм» (Москва, Россия, 2018); IV Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге» (Санкт-Петербург, Россия, 2018); International Conference of Young Scientists «Advances in Botany and Ecology» (Кирилловка, Украина, 2018); 25th International Diatom Symposium (Берлин, Германия, 2018); II Международную научную школу-конференцию «Цианопрокариоты / цианобактерии: систематика, экология, распространение» (Сыктывкар, Россия, 2019); V Международную научно-методологическую конференцию «Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции сельскохозяйственных растений» (Москва, Россия, 2019); XVI Международную научную конференцию диатомологов «Диатомовые водоросли: морфология, систематика, флористика, экология, палеогеография, биостратиграфия» (Звенигород, Россия, 2019); 2 Międzynarodowa konferencja naukowa Wyższa Szkoła Techniczna w Katowicach «Technologie informacyjne i innowacyjne W XXI wieku» (Катовице, Польша, 2019); VI International Conference «Advances in modern phycology» (Киев, Украина, 2019); III Всероссийскую научно-практическую конференцию с международным участием «Водоросли и цианобактерии в природных и сельскохозяйственных экосистемах» (Киров, Россия, 2020); II Международную научную конференцию молодых ученых «Современные проблемы экспериментальной ботаники» (Минск, Беларусь, 2020); XX Международную научно-практическую конференцию «Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии» (Барнаул, Россия, 2021); Международную научную конференцию «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, Россия, 2021); Всероссийскую научную конференцию с международным участием «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге» (Нижний Новгород, 2021); XVII Международную научную конференцию «Диатомовые водоросли: морфология, биология, систематика, флористика, экология, палеогеография, биостратиграфия» (Минск, Беларусь, 2021); VI Всероссийскую научную конференцию с международным участием и школу молодых ученых «Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии» (Звенигород, Россия, 2022); IV Международную научную школу-конференцию «Цианопрокариоты/цианобактерии: систематика, экология, распространение, использование в биотехнологии» (Уфа, Россия, 2022); Всероссийскую конференцию «Коллекции как основа изучения генетических ресурсов растений и грибов» в рамках Первого научного форума «Генетические ресурсы России» (Санкт-Петербург, Россия, 2022); II Международную научно-практическую конференцию «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, Россия, 2022).

Результаты, вошедшие в диссертацию, представлялись в доклад Президента РАН в 2019–2021 г. как важнейшие результаты ИФР РАН, представлялись для ежегодного отчета Научного совета РАН в области микробиологии, в области биотехнологии от ИФР РАН в 2020 г.

Значительная часть результатов диссертации получена при выполнении следующих проектов под руководством соискателя:

РНФ 20-74-10076 «Генетическая и эколого-биохимическая паспортизация и разработка оптимальных технологий культивирования водорослей и цианобактерий для получения биологически активных метаболитов»;

РНФ 18-74-00095 «Скрининг водорослей-продуцентов жирных кислот, повышающих эффективность кормов для аквакультуры»;

РФФИ 19-04-00326 А «Молекулярная филогения и систематика рода *Nostoc Vaucher ex Bornet & Flahault* (Cyanoprokaryota)»;

Quarry Life Award «Молекулярная экология и адаптация водорослей в формировании целевых экосистем карьера Гурово»;

Quarry Life Award «Баркодинг микроводорослей – первый этап масштабного изучения биоразнообразия и мониторинга карьеров».

Часть результатов диссертации получена при выполнении проектов, в которых соискатель являлся исполнителем:

Грант РНФ № 19-14-00320 «Современная система морских и пресноводных диатомовых водорослей (Achnanthes, Naviculales): синтез морфологических и молекулярных данных»;

Грант РНФ № 14-14-00555 «Биогеография и систематика диатомовых водорослей Евразии: от концепции космополитизма к региональному эндемизму?»;

Грант РФФИ А № 17-04-00042 «Молекулярная филогения и систематика диатомовых водорослей семейства Gomphonemataceae Kutzing»;

Грант РФФИ ИНД\_а № 17-54-45038 «Флора диатомовых водорослей и цианобактерий Индии: молекулярно-генетическое изучение эндемичных и космополитных таксонов в районе высокого биоразнообразия (Западные Гаты)».

За результаты, вошедшие в диссертацию, автор удостоен премии правительства Москвы молодым ученым в номинации «Биология» (2022 г.).

### **Личный вклад автора**

Сбор и изучение материала выполнены автором лично или при его активном участии. Автором осуществлены постановка задачи, планирование и проведение экспериментальных исследований, анализ полученных данных и обобщение результатов, подготовка публикаций и апробация материалов работы, представление докладов по полученным результатам на международных и всероссийских конференциях, формирование научного коллектива для выполнения работ. Доклад по совокупности работ подготовлен автором лично. В ряде случаев образцы для исследований предоставлены коллегами, о чем указано в соответствующих публикациях. В публикациях права соавторов не нарушены.

### **Публикации по теме работы**

Положения и результаты диссертации опубликованы в 39 статьях в ведущих международных научных журналах первого и второго квартилей по базам данных Scopus и Web of Science за последние 10 лет, в т.ч. 24 статьи в журналах первого квартиля: Journal of Phycology (5 статей), Scientific Reports (3 статьи), Algal Research (2 статьи), Plants (2 статьи), Algae (1 статья), Biology (1 статья), Cells (1 статья), Environmental Science and Pollution Research (1 статья), European Journal of Phycology (1 статья), Fottea, Olomouc (1 статья), International Journal of Environmental Science and Technology (1 статья), Journal of Applied Phycology (1 статья), Microbial Ecology (1 статья), Phycologia (1 статья), Reviews in Environmental Science and Bio/Technology (1 статья), Water (1 статья) и 15 статей в журналах второго квартиля: PhytoKeys (3 статьи),

Phytotaxa (2 статьи), Cryptogamie, Algologie (2 статьи), Russian Journal of Plant Physiology (2 статьи), Nova Hedwigia, Beiheft (2 статьи), Eurasian Soil Science (1 статья), European Journal of Phycology (1 статья), Fottea, Olomouc (1 статья), Microorganisms (1 статья).

### **Благодарности**

Автор выражает глубокую признательность своему научному консультанту, д.б.н. Куликовскому Максиму Сергеевичу за внимание и всестороннюю поддержку на всех этапах работы. Автор благодарен сотрудникам лаборатории молекулярной систематики водных растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева к.б.н. А.М. Глущенко, к.б.н. Д.А. Капустину, к.б.н. Е.М. Кезля, З.В. Кривовой, к.б.н. Н.В. Лобусу, к.б.н. С.Ю. Мальцевой, Н.А. Шкуриной за помощь и ценные советы. Автор благодарит Ю.А. Подунай за помощь в выделении штаммов микроводорослей и к.б.н. Е.С. Гусева за сотрудничество в работе с Synurophyceae. Автор признателен к.б.н. А.Б. Боровкову за совместную работу и плодотворное сотрудничество. Автор сердечно благодарит д.б.н., проф. И.А. Мальцева за неоценимую помощь в процессе работы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Систематика и описание новых для науки таксонов микроводорослей и цианобактерий и проблема криптических видов**

Изучение биоразнообразия – ключ к решению многих теоретических проблем и практических задач. Использование молекулярно-генетических методов значительно расширило возможности идентификации организмов, в том числе микроводорослей и цианобактерий. Произошел быстрый рост информации о новых, неизвестных науке видах (A38; A36; A35; A33; A31; A30; A22–A25; A17–A20; A15; A13; A12; A8–A10; A4–A6). Для оценки биоразнообразия микроводорослей и цианобактерий считается целесообразным использование интегративного подхода, учитывающего кроме морфологических также молекулярные, ультраструктурные, биохимические, физиологические и экологические данные (A35; A19; A18; A10; A5).

Диатомовые водоросли широко распространены как в водных, так и почвенных местообитаниях и, как показывают современные методы исследования, характеризуются большим разнообразием. Способность к существованию в разных условиях неизбежно ведет к широкому географическому распространению отдельных видов, и именно на этом основывается известная концепция космополитизма диатомовых, которая на данное время находится в центре научной дискуссии. Новые данные о разнообразии и распространении диатомовых водорослей, безусловно, будут способствовать уточнению особенностей их распространения.

Согласно современным подходам, изучение этой группы микроводорослей основывается прежде всего на результатах изучения морфологии и ультраструктуры методами световой и сканирующей электронной микроскопии, а также на данных о нуклеотидных последовательностях ядерных (18S rRNA, 28S rRNA) и хлоропластных (в первую очередь *rbcL*) генов. Дополнительную информацию несут результаты биохимических, физиологических и экологических исследований. Такой подход позволил нам описать новые виды и роды диатомовых водорослей, уточнить филогенетическое и таксономическое положения ряда таксонов, обосновать новые таксономические комбинации, дополнить информацию относительно криптических таксонов, что важно с позиции понимания их биогеографии (Fontaneto, 2011; A17; A7).

Молекулярно-генетические исследования наряду с анализом морфологических признаков новых и уже известных видов послужили основой выделения и описания 2 новых родов диатомовых водорослей: *Dorofeyukea* Kulikovskiy, Maltsev, Andreeva, T. Ludwig et Kociolek и *Gogorevia* Kulikovskiy, Glushchenko, Maltsev et Kociolek (A30; A23).

Изучение морфологии и ультраструктуры, исследование нуклеотидных последовательностей генов 18S rRNA, 28S rRNA, *rbcL* с последующим молекулярно-генетическим анализом стали основой описания 19 новых для науки видов диатомовых водорослей: *Achnantheidium tineae* Tseplik, Kulikovskiy, Kociolek et Maltsev (референсный штамм ind296 из перифитона оз. Темпл, о. Сулавеси, Индонезия) (A20); *Aneumastus mongolotusculus* Maltsev, Andreeva et Kulikovskiy (штамм mnp71, бентос, оз. Хубсугул, Монголия) (A33); *Dorofeyukea indokotschyi* Kulikovskiy, Maltsev, Andreeva et Kociolek (штаммы ind313, ind365, бентос, оз. Сентани, Папуа, Индонезия) (A30); *Gogorevia ovalis* Kulikovskiy, Glushchenko, Maltsev et Kociolek (VN324, VN352 и VN362, перифитон, оз. Бай Транг, Вьетнам) (A23); *Gogorevia rinatii* Kulikovskiy, Glushchenko, Maltsev et Kociolek (VN311, VN386, VN358, VN398 и VN342, бентос, оз. Бай Сен, Вьетнам) (A23); *Hantzschia attractiva* Maltsev et Kulikovskiy (штамм MZ–BH11, почва, березняк, Ярославская обл., Россия) (A17); *Hantzschia belgica* Maltsev et Kulikovskiy (штамм (Sterre3)а, почва, г. Гент, Восточная Фландрия, Бельгия) (A17); *Hantzschia parva* Maltsev et Kulikovskiy (MZ–BH3, почва, кладбище, Херсонская обл., Россия; MZ–BH4, почва, смешанное насаждение, Полтавская обл., Украина) (A17); *Hantzschia pseudomongolica* Maltsev et Kulikovskiy (штаммы (Mo1)а, (Mo1)е и (Mo1)т, почва, Хангайн нуруу, Монголия) (A17); *Hantzschia stepposa* Maltsev et Kulikovskiy (MZ–BH12, лесная подстилка, насаждение *Quercus robur*, Запорожская обл., Россия) (A17); *Madinithidium vietnamica* Kulikovskiy, Andreeva, Maltsev et Kociolek (SVN252, морская лагуна На Фу, Вьетнам) (A30); *Nupela indonesica* Kulikovskiy, Maltsev, Glushchenko et Kociolek (ind121, ind219, планктон, о. Сулавеси, Индонезия) (A25); *Pinnularia insolita* Kezlya, Maltsev, Krivova et Kulikovskiy (VP280, почва, тропический лес, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A6); *Pinnularia microgibba* Kezlya, Maltsev, Krivova et Kulikovskiy (VP289, VP292, сухая болотная почва, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A6); *Pinnularia minigibba* Kezlya, Maltsev, Krivova et Kulikovskiy (VP284, почва, поле, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A6); *Pinnularia ministomatophora* Kezlya, Maltsev, Krivova et Kulikovskiy (VP563, почва, русло пересохшего ручья, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A6); *Pinnularia paradubitabilis* Kezlya, Maltsev, Krivova et Kulikovskiy (VP236, обрастания на базальте, тропический лес, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A6); *Pinnularia vietnamogibba* Kezlya, Maltsev, Krivova et Kulikovskiy (VP290, VP294, сухая болотная почва, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A6); *Sellaphora terrestris* Glushchenko, Kezlya, Maltsev et Kulikovskiy (штаммы VP304, VP272, VP303 и VP299, почва, поле, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A8).

Филогенетический анализ и расчет *p*-дистанции был успешно использован при описании 11 новых видов пеннатных диатомовых водорослей: *Achnantheidium gladius* Tseplik, Kulikovskiy, Glushchenko et Genkal (штамм ind391, планктон, оз. Матана, Индонезия) (A12); *Symbella baicalaspera* Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (штаммы B207, B290, перифитон, р. Загза, Россия) (A9); *Symbopleura natellia* Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (B209, перифитон, р. Загза, Россия) (A15); *Karayevia chelonica* Tseplik, Glushchenko, Kociolek et Kulikovskiy (SVN511, SVN529, SVN562, перифитон, Южно-Китайское море, Нячанг, Вьетнам) (Tseplik et al., 2022); *Mayamaea vietnamica*

Glushchenko, Kezlya, Kulikovskiy et Kociolek (VP1, почва, тропический лес, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A22); *Placoneis asymmetricus* Glushchenko, Kezlya, Kulikovskiy et Kociolek (VP57, почва, тропический лес, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A4); *Placoneis baikaloelginensis* Kezlya, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (B703, мох, болото, берег оз. Байкал, Россия) (A13); *Placoneis cattiensis* Glushchenko, Kezlya, Kulikovskiy et Kociolek (VP81, почва, тропический лес, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A24); *Placoneis neohambergii* Kezlya, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (VN364, бентос, пресноводный водоем возле реки Кай, Кхань Хоа, Вьетнам) (A13); *Placoneis subundulata* Kezlya, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (VN1199, бентос, временный водоем, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A13); *Sellaphora balashovae* Andreeva, Kulikovskiy et Kociolek (B385, бентос, оз. Фролиха, Россия) (A36).

Результаты исследований с помощью светового и сканирующего электронного микроскопов стали основой для описания 4 новых видов *Hannaea* R.M. Patrick из Азии: *H. dorofeyukae* Kulikovskiy, Glushchenko, Q. Liu et Kociolek, *H. mongolica* Glushchenko, Kulikovskiy, Q. Liu et Kociolek и *H. pamirensis* Glushchenko, Kulikovskiy, Q. Liu et Kociolek и *H. tibetiana* Q. Liu, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (A31). В ходе этого исследования были проанализированы природные образцы из Тибета, Монголии и горного Памира в Западной Азии. Новые виды *Hannaea* отличались от уже известных формой и размером створок, количеством рядов ареол в штрихе, а также количеством двугубных выростов (римопортул). В целом сделан вывод, что Азия является важным центром разнообразия представителей рода *Hannaea*.

Нами предложено 23 новые таксономические комбинации: *Dorofeyukea ancisa* (Hustedt) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Dorofeyukea grimmei* (Krasske in Hustedt) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Dorofeyukea ivatoensis* (Metzeltin et Lange-Bertalot) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Dorofeyukea kotschyi* (Grunow) Kulikovskiy, Kociolek, Tusset et T. Ludwig (на основании штамма ind381) (A30); *Dorofeyukea orangiana* (R.M. Patrick) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Dorofeyukea rostellata* (Hustedt) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Dorofeyukea savannahiana* (R.M. Patrick) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Dorofeyukea tenuipunctata* (Hustedt) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Dorofeyukea texana* (R.M. Patrick) Kulikovskiy et Kociolek (A30); *Gogorevia australexigua* (Van de Vijver) Kulikovskiy et Kociolek (A23); *Gogorevia constricta* (Torka) Kulikovskiy et Kociolek (A23); *Gogorevia exilis* (Kützing) Kulikovskiy et Kociolek (A23); *Gogorevia parexigua* (Metzeltin et Lange-Bertalot) Kulikovskiy et Kociolek (A23); *Gogorevia rostellata* (Cleve-Euler) Kulikovskiy, Lange-Bertalot et Kociolek (A23); *Gogorevia uniseriata* (Yan Shi et B.-H. Kim) Kulikovskiy et Kociolek (штаммы ef26, ef69, ef66, ef42) (A23); *Hannaea hattoriana* (Meister) Q. Liu, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (A31); *Hannaea orientalis* (Skuja) Q. Liu, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (A31); *Hannaea recta* (Skvortzow et Meyer) Q. Liu, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (A31); *Hannaea subarcus* (Iwahashi) Q. Liu, Glushchenko, Kulikovskiy et Kociolek (A31); *Stephanocyclus cryptica* (Reimann, Levin et Guillard) Kulikovskiy, Genkal et Kociolek (A7); *Stephanocyclus gamma* (Sovereign) Kulikovskiy, Genkal et Kociolek (A7); *Stephanocyclus meneghiniana* (Kützing) Kulikovskiy, Genkal et Kociolek (штаммы M241, M240, M239, M238, M237, ryb10, ef1, M187, M100, ryb8, mnp198 и ryb14) (A7); *Stephanocyclus planum* Skabitschevsky emend. Kulikovskiy, Genkal et Kociolek (штаммы B012, B016) (A7).

Впервые проведено изучение филогенетического положения 9 родов диатомовых водорослей: *Aneumastus* D.G. Mann et A.J. Stickle (A33); *Brachysira* Kützing (A25); *Diadsmis* Kützing (Андреева и др., 2016; A25); *Envekadea* Van de Vijver, Gligora, Hinz,

Kralj et Cocquyt (A38); *Humidophila* (Lange-Bertalot et Werum) R.L.Lowe et al. (Андреева и др., 2016; A25); *Karayevia* Round et L. Bukhtiyarova ex Round (A30; Tseplik et al., 2022); *Madinithidium* C. Desrosiers, A. Witkowski et C. Riaux-Gobin (A30); *Microcostatus* J.R. Johansen et J.C. Sray (A8) и *Stephanocyclus* Skabitshevsky (A7).

В ходе исследований были получены новые данные о географическом распространении 18 уже известных видов диатомовых водорослей, местах их обитания, морфологических и молекулярно-генетических особенностях на основании изучения выделенных новых штаммов и природных популяций: *Craticula ambigua* (Ehrenberg) D.G. Mann (штамм B060, р. Селенга, Россия) (A30); *Craticula cuspidata* (Kützing) D.G. Mann (ind367, оз. Сентани, Папуа, Индонезия) (A30); *Cyclotella cryptica* Reimann, J.C. Lewin et Guillard (SBV12, оз. Байкал, Россия) (A37); *Cyclotella meneghiniana* Kützing (SBV11, пресноводный водоем, Вьетнам; SBV23, оз. Байкал, Россия) (A37); *Cymbella himalaspera* Jüttner et Van de Vijver (B271, оз. Байкал, Россия) (A9); *Diademsia confervaceae* Kützing (ind24, бентос, оз. Тоба, о. Сумасир, Индонезия; ind265, бентос, оз. Батур, о. Бали, Индонезия) (Андреева и др., 2016; A25); *Envekadea pseudocrassirostris* (Hustedt) Van de Vijver, Gligora, Hinz, Kralj et Cocquyt (i57, i59, бентос, солоноватое озеро, о. Камбоде, Индонезия) (A38); *Gomphonema angustissimum* Hustedt (планктон, оз. Матана, Индонезия) (A27); *Gomphonema longissimum* Hustedt (ind394, ind395, бентос, оз. Матана, о. Сулавеси, Индонезия) (A27); *Gomphonema subtiliforme* Hustedt (планктон, оз. Матана, Индонезия) (A27); *Gomphonema woltereckii* Hustedt (планктон, оз. Матана, Индонезия) (A27); *Nitzschia* cf. *carinospeciosa* Lange-Bertalot et Kulikovskiy (SBV25, SBV26, оз. Байкал, Россия) (A37); *Nupela lesothensis* (Schoeman) Lange-Bertalot (ind168, ind170, планктон, о. Бали, Индонезия) (A25); *Paralia longispina* S. Konno et R.W. Jordan (SBV19, Южно-Китайское море, Нячанг, Вьетнам) (A37); *Psammothidium subatomoides* (Hustedt) Bukhtiyarova et Round (B352, B356, оз. Байкал, Россия) (A20; A12); *Stauroneis gracilis* Ehrenberg (B540, р. Эхе-Угуй, Россия, B651, оз. Тунку-Нур Россия) (A30); *Stauroneis heinii* Lange-Bertalot et Krammer (B644, оз. Фролиха, Россия) (A30); *Stauroneis subgracilis* Lange-Bertalot et Krammer (B376, оз. Фролиха, Россия) (A30).

Исследования таксономического разнообразия и филогенетических отношений внутри зеленых водорослей указывают на наличие скрытого разнообразия в пределах Chlorophyceae и Trebouxiophyceae. Это подтвердилось в ходе проведенных исследований. В результате изучения морфологии, реконструкции филогении с использованием нуклеотидных последовательностей генов 18S rRNA, *rbcL* и предсказания вторичной структуры ITS2 было описано 2 новых для науки вида: *Nephrochlamys yushanlensis* Maltsev et Maltseva (штамм MZ-Ch62, планктон, р. Юшанлы, Запорожская обл., Россия) (A18); *Parietochloris grandis* Maltsev et Maltseva (MZ-Ch5, почва, насаждение *Pinus sylvestris* L., Днепропетровская обл., Украина) (A35). С использованием интегративного подхода уточнено распространение и осуществлено описание морфологических и генетических особенностей новых популяций 6 видов зеленых микроводорослей: *Bracteacoccus bullatus* Fuciková, Flechtner et L.A. Lewis (штамм MZ-Ch32, лесная подстилка, насаждение *Robinia pseudoacacia* L. Днепропетровская обл., Украина; штамм MZ-Ch11, почва, насаждение *Robinia pseudoacacia*, Запорожская обл., Россия) (A34; A26); *Chlorococcum oleofaciens* Trainor et Bold (MZ-Ch4, MZ-Ch27, лесная подстилка, дубовый лес, Днепропетровская обл., Украина) (Maltsev et al., 2017); *Coccomyxa elongata* Chodat et Jaag (MZ-Ch64, планктон, р. Молочная, Запорожская обл., Россия) (A29); *Coelastrella multistriata* (Trenkwalder) Kalina et Puncochárová (MZ-Ch23, промышленный отвал, известняковое

месторождение, Тульская обл., Россия) (A14; Maltseva et al., 2022); *Protosiphon botryoides* (Kützing) Klebs (MZ–Ch14, почва, дубовый лес, Днепропетровская обл., Украина) (Maltseva et al., 2017); *Pseudomuriella engadinensis* (Kol et F.Chodat) Fuciková, Rada et L.A. Lewis (MZ–Ch33, почва, смешанное насаждение *Robinia pseudoacacia* и *Pinus pallasiana* D. Don, Запорожская обл., Россия) (A32).

Современные исследования цианобактерий свидетельствуют о их высокой морфологической изменчивости в различных условиях обитания. Поэтому для таксономической идентификации целесообразно использование интегративного подхода. Он снижает риск необоснованного объединения или разъединения таксонов при идентификации штаммов со схожим морфотипом. С использованием анализа морфологических признаков, филогении на основе гена 16S rRNA и предсказания вторичной структуры региона 16S–23S ITS описано 3 новых вида цианобактерий из Nostocales: *Aliinostoc vietnamicum* S. Maltseva, E. Kezlya et Y. Maltsev (штамм VP225, почва, тропический лес, национальный парк Кат Тьен, Вьетнам) (A5); *Desmonostoc caucasicum* S. Maltseva, Kulikovskiy et Maltsev (MZ–C154, почва, высокогорье, Кавказ, Россия) (A10); *Iningainema sahyadrensis* Y. Maltsev et Kulikovskiy (Iac9, биологическая корка, горы Западные Гаты, Индия) (A19). Изучение морфологии и исследование нуклеотидных последовательностей генов *msc* и *nda*, участвующих в биосинтезе цианотоксинов, позволили получить новые данные о географическом распространении *Nostoc linckia* Bornet ex Bornet et Flahault (Maltsev et al., 2020).

Проблема криптических видов рассмотрена на примере диатомовых водорослей из родов *Hantzschia* Grunow и *Stephanocyclus* (A17; A7).

Род *Hantzschia* – до недавнего времени небольшой таксон диатомовых водорослей с менее чем пятьюдесятью известными видами, обитающими в разнообразных местообитаниях: начиная от пресных, соленых водоемов и заканчивая наземными и почвенными биотопами. Основными морфологическими критериями для разграничения видов внутри рода *Hantzschia* были: количество штрихов и ареол на створке, положение и форма фибул, форма створок панциря. Принятие узкой концепции вида многими исследователями способствовало описанию большого числа новых таксонов, в том числе и внутри рода *Hantzschia*. Это привело к резкому увеличению разнообразия внутри рода и в настоящее время известно более 250 описанных таксонов *Hantzschia* (A17; Guiry, Guiry, 2022).

До наших исследований разнообразие представителей рода *Hantzschia* среди почвенных диатомовых водорослей на территории Евразии ограничивалось небольшим количеством видов, в первую очередь *H. abundans* Lange-Bertalot, *H. amphioxys* (Ehrenberg) Grunow, *H. elongata* Grunow и *H. vivax* (W. Smith) Peragallo, включая их некоторые формы. Это приводило к ложному выводу о преобладании в почвах данного региона только космополитических видов.

Всего нами была изучена морфология, ультраструктура и филогения 25 почвенных штаммов диатомовых водорослей, которые могли быть отнесены к *H. amphioxys sensu lato*. Применение узкой концепции вида к *H. amphioxys sensu lato*, считающейся видом с чрезвычайно изменчивой морфологией и размерами, позволило выявить реальное разнообразие и изучить биогеографию этой группы. Моноклональные штаммы диатомовых водорослей были выделены из проб лесной подстилки и почвы, отобранных на территории разных лесных, луговых и степных биогеоценозов России и Украины, проб горных почв Монголии, почв урбозкосистем Бельгии и Украины. Штаммы водорослей изучались с помощью световой и электронной микроскопии, а также молекулярно-филогенетического анализа с

использованием нуклеотидных последовательностей двух ядерных генов (18S rRNA, 28S rRNA) и одного хлоропластного (*rbcL*).

Детальные морфологические и молекулярно-генетические исследования показали, что выборка состояла из семи различных видов. Одиннадцать штаммов принадлежало к известным видам *H. amphioxys* sensu stricto и *H. abundans* sensu stricto, а на основании остальных штаммов было описано 5 новых для науки видов: *H. attractiva*, *H. belgica*, *H. parva*, *H. pseudomongolica* и *H. stepposa* (Рис. 1). Использование интегративного подхода для объемной выборки почвенных штаммов *Hantzschia* впервые позволило выделить основные диакритические признаки и осуществить их видовую идентификацию, а именно: размер створки, количество штрихов и ареол в 10 мкм, положение внутренних и внешних центральных окончаний шва. Именно эти морфологические характеристики коррелировали с выделенными кладами в байесовском филогенетическом дереве, построенном с использованием последовательностей генов *rbcL* и 28S rRNA (Рис. 2) (A17).

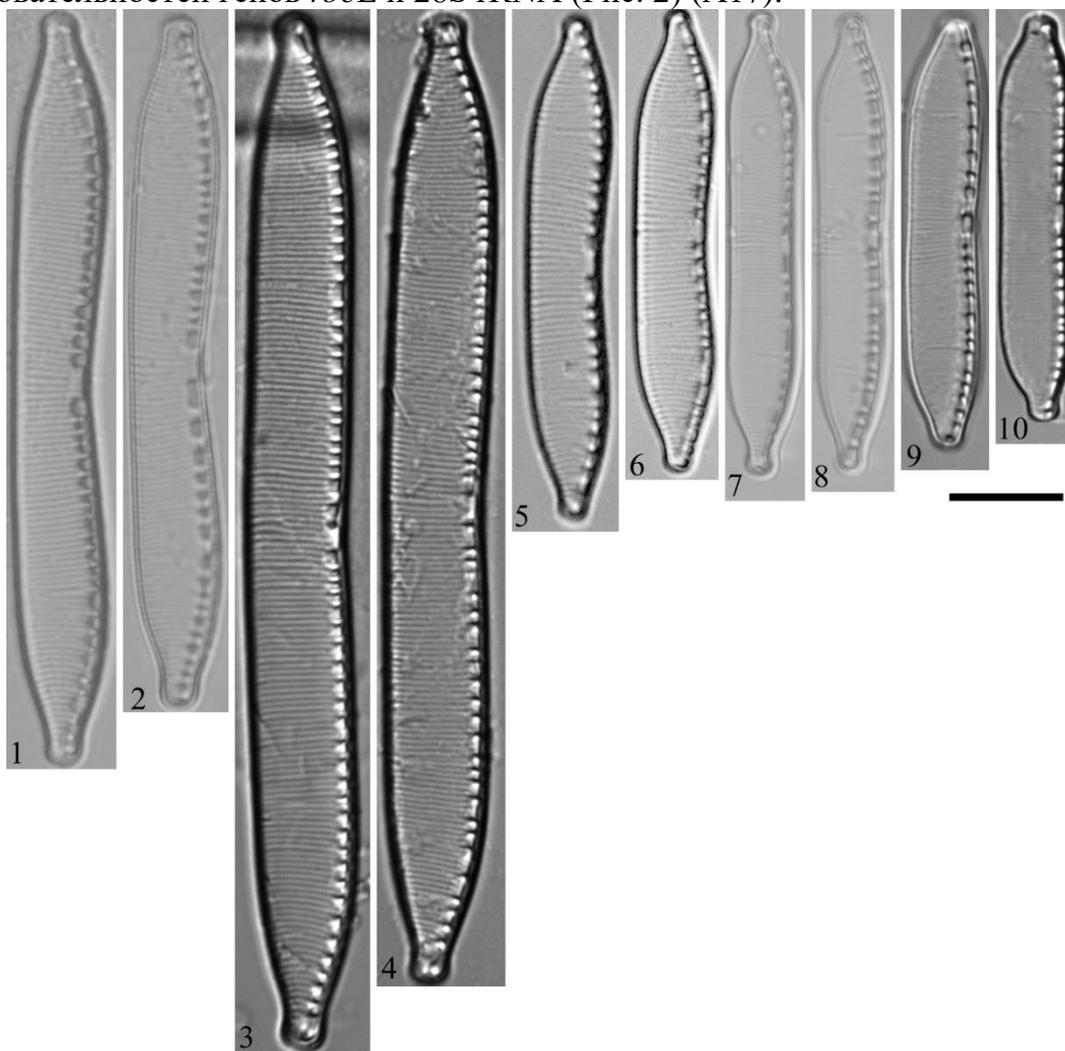


Рисунок 1. Световые микрофотографии новых видов *Hantzschia*: (1, 2) *H. attractiva*; (3, 4) *H. pseudomongolica*; (5, 6) *H. parva*; (7, 8) *H. stepposa*; (9, 10) *H. belgica*. Масштабная линейка 10 мкм (A17).

Основываясь на изучении морфологической изменчивости и филогении почвенных видов *Hantzschia* из географически удаленных экосистем, был сделан вывод, что на территории Евразии существуют как действительно космополитные виды диатомовых водорослей, например *H. amphioxys* sensu stricto и *H. abundans* sensu

stricto, так и симпатрические популяции псевдокриптических таксонов, ранее отождествляемых с *H. amphioxys* sensu lato (A17).

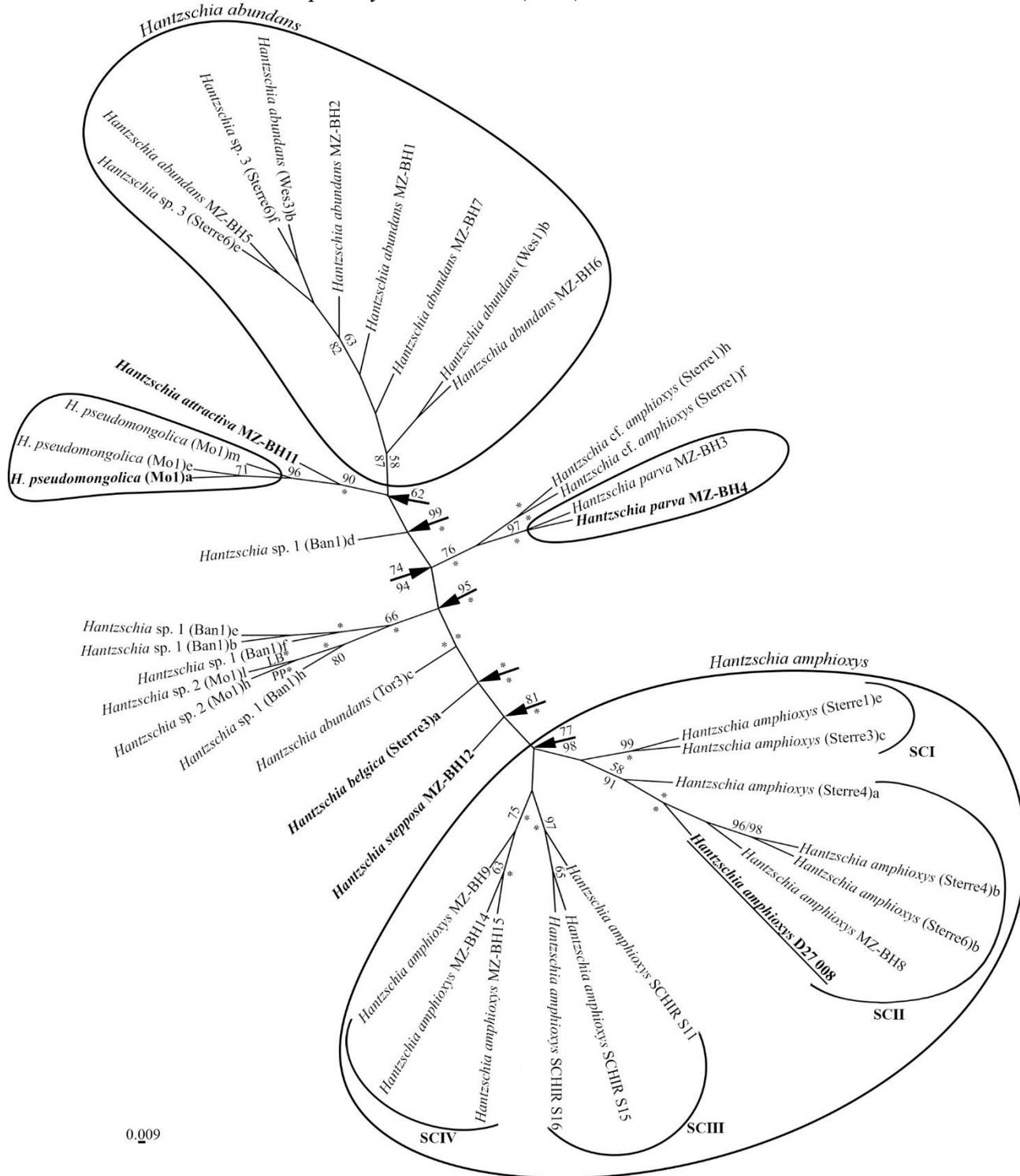


Рисунок 2. Байесовское дерево для штаммов *Hantzschia* на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *rbcL* и 28S rRNA длиной 1785 п.н. 40 пеннатных диатомовых водорослей. Типовые штаммы выделены жирным шрифтом. Подчеркнут эпитип *H. amphioxys*. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<80 не указаны). \* 100% статистическая поддержка (A17).

*Cyclotella* (Kützing) Brébisson sensu lato является примером комплекса видов центрических диатомовых водорослей с очень широким диапазоном морфологических признаков. Род *Cyclotella* sensu lato легко отличить от других центрических диатомовых водорослей по наружной стороне створки, имеющей два разных рисунка: с радиально исчерченной краевой частью и отчетливо плоским или тангенциальным, радиально-волнистым центральным полем. Центральное поле может быть гладким или морщинистым и холмистым. Центральные фультопортулы (выросты с опорами) могут присутствовать или отсутствовать на поверхности створки, а римопортулы (двугубые выросты) есть на загибе створки, а у некоторых видов – и на поверхности створки (Куликовский и др., 2016). Такое разнообразие морфологических признаков привело к включению в состав рода *Cyclotella* нескольких сотен видов (A7).

Вариабельная морфология и включение большого количества видов инициировали таксономические ревизии внутри *Cyclotella* sensu lato и способствовали поиску диакритических признаков, которые бы соотносились с существующими филогенетическими линиями внутри центрических диатомовых водорослей. Работы Håkansson (2002), Nakov et al. (2015) подчеркнули таксономическую важность размещения и строения римопортул, а также положения ареол и формы створок. В результате проведенных исследований из рода *Cyclotella* были выделены роды *Discostella* V. Houk et R. Klee, *Lindavia* (Schütt) De Toni et Forti, *Puncticulata* Håkansson и *Tertiarius* H. Håkansson et G. Khursevich.

Изучение морфологии и филогении 13 пресноводных штаммов центрических диатомовых водорослей, в том числе штаммов B012 и B016 из оз. Байкал, позволило нам рассмотреть вопрос криптического разнообразия космополитичного вида *Cyclotella meneghiniana* Kützing sensu lato (A7). Установлено, что популяция из оз. Байкал по морфологическим признакам полностью соответствовала ранее описанному из р. Обь виду *Stephanocyclus planum* Skabitshevsky (Скабичевский, 1975). Оставшиеся штаммы ef1, M100, M187, M237–M241, mnp198, ryb8 и ryb10 могли быть формально определены как *C. meneghiniana*. Однако, согласно реконструированной филогении с использованием генов *rbcL* и 18S rRNA, популяция из оз. Байкал и остальные изучаемые штаммы *Cyclotella* sensu lato сформировали отдельную, независимую от типового вида *Cyclotella distinguenda* Hustedt, филогенетическую линию (Рис. 3).

Полученные результаты показали, что *Cyclotella* sensu lato является полифилетической группой. В связи с этим нами был восстановлен *Stephanocyclus* в качестве самостоятельного рода, который отличается от рода *Cyclotella* строением внешних отверстий римопортул, лицевой части и загиба створки в целом (A7). Согласно полученной филогении центрических диатомовых водорослей род *Stephanocyclus* является монофилетической кладой (Рис. 3) и, помимо *S. planum*, включает *S. cryptica* (Reimann, Levin et Guillard) Kulikovskiy, Genkal et Kociolek, *S. gamma* (Sovereign) Kulikovskiy, Genkal et Kociolek и *S. meneghiniana* (Kützing) Kulikovskiy, Genkal et Kociolek. Соответственно, исследуемые пресноводные штаммы ef1, M100, M187, M237–M241, mnp198, ryb8 и ryb10 были идентифицированы как *S. meneghiniana*. В тоже время признание *S. planum* указало на полифилетичность штаммов, которые могли быть определены как *S. meneghiniana* sensu lato, и подтвердило наличие комплекса криптических таксонов внутри *S. meneghiniana* (A7).

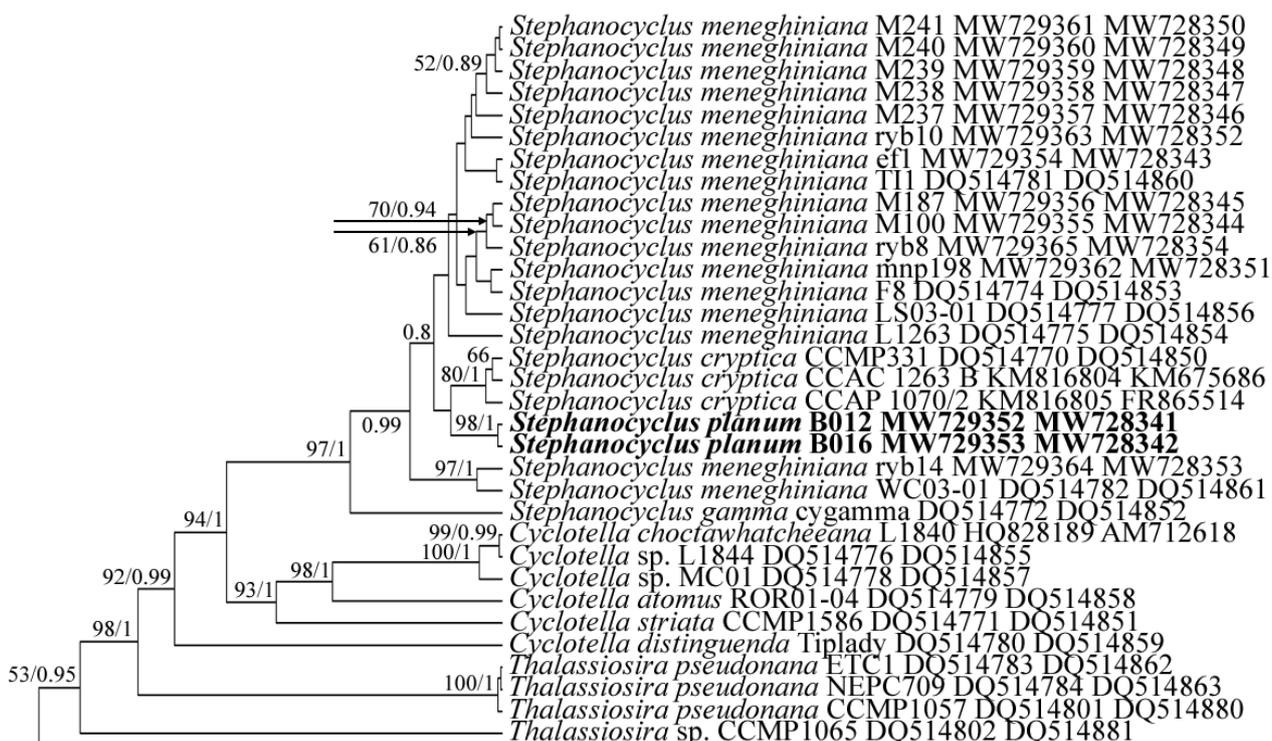


Рисунок 3. Фрагмент байесовского дерева для штаммов *Stephanocyclus* на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *rbcL* и 18S rRNA длиной 1541 п.н. 112 центральных диатомовых водорослей. Штаммы *Stephanocyclus planum* выделены жирным шрифтом. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<0,8 не указаны) (A7).

В целом, применение интегративного подхода к изучению биоразнообразия позволило описать 2 новых для науки рода – *Gogorevia* и *Dorofeyukea* (Bacillariophyceae), 39 видов цианобактерий, диатомовых и зеленых водорослей (из родов *Achnantheidium* Kützing, *Aneumastus*, *Cymbella* C. Agardh, *Cymbopleura* (Krammer) Krammer, *Dorofeyukea*, *Gogorevia*, *Hannaea*, *Hantzschia*, *Karayevia*, *Madinithidium*, *Mayamaea* Lange-Bertalot, *Nupela* Vyverman et Compère, *Pinnularia* Ehrenberg, *Placoneis* Mereschowsky, *Sellaphora* Mereschowsky (Bacillariophyceae); *Nephrochlamys* Korshikov (Chlorophyceae); *Parietochloris* S. Watanabe et G.L. Floyd (Trebouxiophyceae); *Aliinostoc* S.N. Bagchi, N. Dubey et P. Singh, *Desmonostoc* P. Hrouzek et S. Ventura, *Iningainema* G.B. McGregor et B.C. Sendall (Cyanophyceae)), предложить 23 номенклатурных комбинации для диатомовых водорослей (*Dorofeyukea*, *Gogorevia*, *Hannaea*, *Stephanocyclus*), а также выявить криптическое разнообразие среди космополитичных видов *Hantzschia amphioxys sensu lato* и *Stephanocyclus meneghiniana sensu lato*.

## Глава 2. Молекулярная филогения отдельных таксонов микроводорослей и цианобактерий и соотношение с морфологическими признаками

Использование молекулярных методов является важным для описания новых таксонов на видовом и родовом уровнях. При этом актуальной задачей является не только использование разных методов и подходов, но и поиск согласованности результатов, в первую очередь, молекулярных и морфологических. Для этого необходимо одновременно с молекулярным анализом проводить ревизию морфологических признаков, которые используются в систематике той или иной

группы автотрофных организмов, а также выявлять морфологические признаки, которые наиболее четко коррелируют с молекулярными результатами.

*Navicula kotschy* Grunow – вид пеннатных диатомовых водорослей, который был описан из термальных вод в Будапеште (Венгрия), и часто встречается в различных регионах Евразии (Куликовский и др., 2016). Долгое время *N. kotschy* относилась к роду *Navicula sensu lato*. Нами исследовано 3 штамма диатомовых водорослей (ind313, ind365, ind381) из пресноводных экосистем Индонезии, которые соответствовали описанию *N. kotschy*. В филогенетическом дереве, полученном на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *rbcL* и 18S rRNA, исследованные штаммы образовали единую кладу с родами *Stauroneis* Ehrenberg, *Prestauroneis* K. Bruder et Medlin, *Craticula* Grunow, *Karayevia*, *Madinithidium*, *Fistulifera* Lange-Bertalot, *Parlibellus* E.J. Cox, *Schizostauron* Grunow, а не представителями *Navicula sensu stricto* (Рис. 4). Детальное изучение морфологии и ультраструктуры штаммов ind313, ind365, ind381 показало наличие уникальной комбинации признаков, которая позволила описать новый род *Dorofeyukea* и перенести в него *N. kotschy*, а также описать новый вид *D. indokotschy* (A30). Представители рода *Dorofeyukea* характеризуются наличием узкого ставроса, окруженного 1-3 неравномерно укороченными штрихами; однорядными пунктирными штрихами; ареолами, покрытыми гименом на внутренней стороне створки; присутствием псевдосепт на концах створок и отсутствием септ (A30).

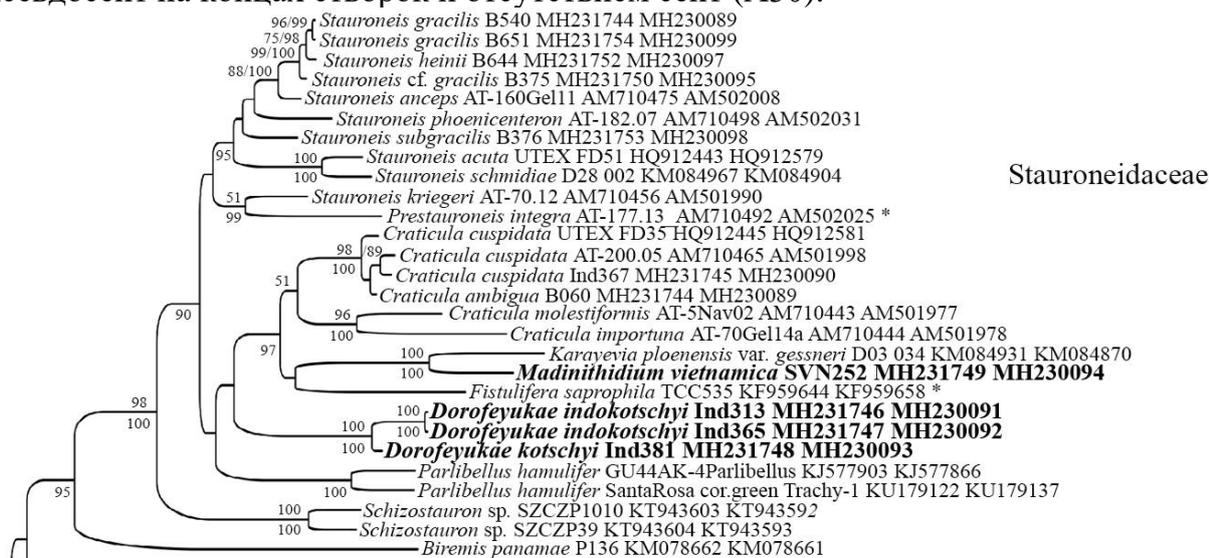


Рисунок 4. Фрагмент байесовского дерева для штаммов *Dorofeyukea* и *Madinithidium* на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *rbcL* и 18S rRNA длиной 1171 п.н. 123 пеннатных диатомовых водорослей. Штаммы *Dorofeyukea* и *Madinithidium* выделены жирным шрифтом. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<90 не указаны). \* таксоны, ранее принадлежавшие к *Navicula* Bory sensu lato (A30).

Важным исследованием, которое показывает связь моношовных и навикулоидных диатомовых водорослей, является молекулярно-генетическое изучение представителей семейства Stauroneidaceae (A30). Мы впервые изучили филогению представителя рода *Madinithidium*. Изначально род был описан как моношовный, но при этом не были изучены хлоропласты и не использовалась филогенетическая реконструкция. С помощью филогенетического анализа на основе

генов *rbcL* и 18S rRNA мы установили, что навикулоидный род *Dorofeyukea* и моношовный род *Madinithidium* относятся к семейству Stauroneidaceae. При этом наличие или отсутствие шва не является ключевым фактором. Главной характеристикой, присущей представителям этого семейства, является наличие гимена с внутренней стороны ареол, двух хлоропластов и псевдосепт на створках. При этом род *Madinithidium* сформировал единую филогенетическую кладу в байесовском дереве вместе с другим моношовным родом *Karayevia* (Рис. 4). Таким образом, к семейству Stauroneidaceae принадлежат следующие роды диатомовых водорослей: *Craticula*, *Dorofeyukea*, *Fistulifera*, *Karayevia*, *Madinithidium*, *Parlibellus*, *Prestauroneis*, *Schizostauron* и *Stauroneis*.

Описание рода *Gogorevia* позволило решить известную таксономическую проблему, связанную со статусом моношовного вида *Achnanthes exigua* Grunow. Род *Gogorevia* был описан нами с помощью комплексных молекулярных и морфологических исследований новых штаммов *Achnanthes exigua* sensu lato (A23). На основе изучения пресноводных штаммов из Вьетнама было описано два новых вида – *Gogorevia rinatii* и *Gogorevia ovalis*. Они характеризовались сходными морфологическими признаками с *Achnanthes exigua* и другими родственными таксонами, которые ранее были переведены в роды *Achnanthidium* и *Lemnicola* Round et Basson. Представители нового рода *Gogorevia* морфологически отличались от видов *Achnanthidium* и *Lemnicola* формой створок, наличием однорядных штрихов, морфологией шва и присутствием выраженного стернума. Проведенное нами филогенетическое исследование с использованием нуклеотидных последовательностей генов *rbcL* и 18S rRNA также показало обособленное положение *Gogorevia* от родов *Achnanthidium* и *Lemnicola* (Рис. 5). Недавно описанный вид *Lemnicola uniseriata* Y. Shi et B.-H. Kim был перенесен нами в род *Gogorevia*. В целом данная работа подтвердила, что таксономическая интерпретация родов, ранее включенных в всеобъемлющий род *Achnanthes* Borg, требует тщательного изучения.

Навикулоидный род *Diadesmis* характеризуется однорядными штрихами на створке, состоящими из 3–4 ареол, и долгое время пополнялся за счет переноса видов из рода *Navicula* после изучения морфологических признаков отдельных представителей (Куликовский и др., 2016). Усовершенствование методов микроскопии, в т.ч. электронной, изучение типовых материалов в последние десятилетия способствовали обратному процессу – некоторые виды *Diadesmis* сперва были перенесены в подрод *Paradiadesmis* Lange-Bertalot et Le Coq, а затем – в новый род *Humidophila*. Однако данные таксономические решения основывались исключительно на морфологических данных без проведения молекулярных исследований. Нами впервые установлено филогенетическое положение родов *Diadesmis* и *Humidophila* на основе баркодингового региона V4 гена 18S rDNA (Андреева и др., 2016; A25). При этом показана обоснованность выделения рода *Humidophila* из рода *Diadesmis*, т.к. в филогенетическом дереве представители двух родов с максимальной статистической поддержкой образуют независимые клады. Установлено, что эти роды не являются родственными и принадлежат к разным семействам (A25).

Впервые показано филогенетическое положение рода диатомовых водорослей *Envekadea*. Молекулярный анализ на основе двух генов (18S rRNA и *rbcL*) показал его наиболее тесную связь с представителями родов *Pinnularia* и *Caloneis* Cleve. Исходя из полученных результатов предложено размещение рода *Envekadea* в семействе Pinnulariaceae (A38). *Aneumastus* – это небольшой пресноводный род, представители

которого характеризуются наличием двух хлоропластов, имеющих H-образную форму со стороны пояска; открытыми порами на пояске и комплексом ареол, покрытых кривумом (Куликовский и др., 2016). Считается, что род *Aneumastus* близок к видам рода *Mastogloia* Thwaites ex W. Smith. К общим чертам относится тип хлоропластов и некоторые аспекты морфологии створок, за исключением наличия камер на вальвокопуде у представителей *Mastogloia*. На основании морфологических характеристик род *Aneumastus* вместе с родом *Mastogloia* был включен в семейство Mastogloiaceae, порядок Mastogloiales (Round et al., 1990). Позже, на основании кладистического подхода, было предложено перенести данный род в порядок Achnanthes (Cox, 2006). Однако до наших работ с использованием молекулярных данных филогенетическое положение рода *Aneumastus* оставалось неизученным. Филогенетический анализ с использованием нуклеотидных последовательностей генов 18S rRNA и *rbcL* впервые подтвердил нахождение рода *Aneumastus* внутри порядка Mastogloiales и опроверг ранее высказанную идею о его принадлежности к Achnanthes (A33; A25). Одновременно нами описан новый вид *A. mongolotusculus* из бентосных образцов оз. Хубсугул (Монголия).

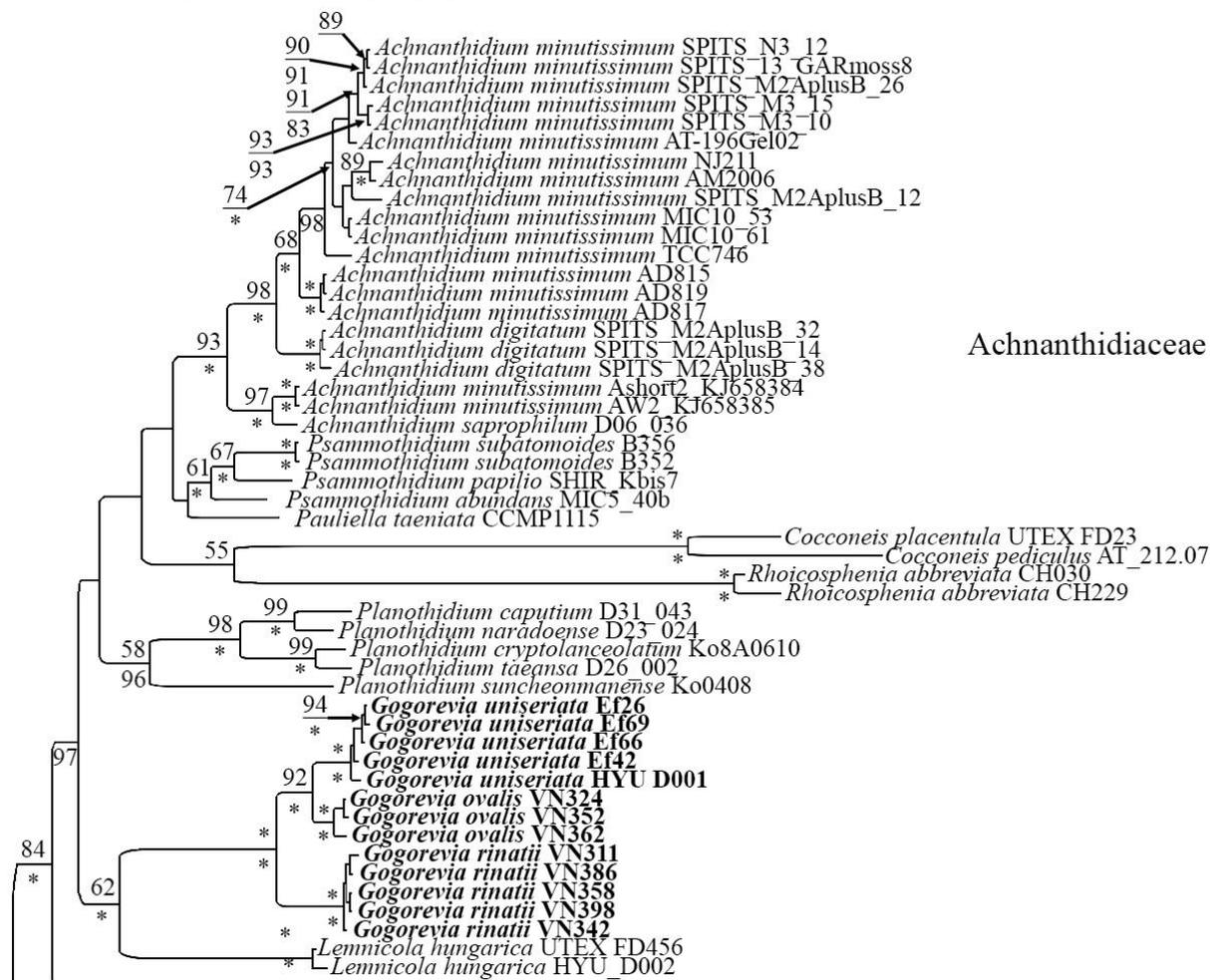


Рисунок 5. Фрагмент байесовского дерева для штаммов *Gogorevia* на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *rbcL* и 18S rRNA длиной 1215 п.н. 148 пеннатных диатомовых водорослей. Штаммы *Gogorevia* выделены жирным шрифтом. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<80 не указаны). \* 100% статистическая поддержка (A23).

*Nupela* – это род диатомовых водорослей, описанный из пресноводных и олиготрофных водоемов. Среди специфических морфологических характеристик этого рода можно выделить редукцию или недоразвитие одной или двух ветвей шва на одной из створок, а также строение удлиненных ареол, которые с наружной стороны створки закрыты гименом. Учитывая расположение ареол продольными рядами и их одинаковое строение на створке и ее загибе, предполагалось, что род *Nupela* близок к роду *Brachysira*. Однако филогенетическое положение *Nupela* с использованием молекулярных подходов не изучалось. Проведенный филогенетический анализ на основе участка V4 гена 18S rRNA и гена *rbcL* для *N. lesothensis* и описанного нового вида *N. indonesica* показал, что род *Nupela* образует самостоятельную кладу и входит в состав более крупной навиколоидной клады с такими родами, как *Diadesmis*, *Luticola* D.G. Mann, *Neidium* Pfitzer, *Scolioleura* Grunow и *Brachysira* (A25).

Использование молекулярных методов наряду с данными о морфологических, ультраструктурных, биохимических, физиологических, экологических характеристиках позволило значительно продвинуться в вопросах установления разнообразия и распространения зеленых микроводорослей. Однако еще многие таксономические конструкции остаются дискуссионными. Продолжают обсуждаться диакритические морфологические признаки, универсальность и специфичность молекулярных маркеров, роль биохимических и других особенностей таксонов при их идентификации. Только точная таксономическая идентификация позволяет выяснить распространение видов и других таксонов, и, соответственно, сформировать представление о закономерностях их биогеографии, видообразования, экологии и использовать эти данные для биотехнологического скрининга.

Одним из малоизученных родов Требухифициевогосе является род *Parietochloris*. Он не формирует монофилетической группы в системе требуксиефициевых водорослей (Neustupa et al., 2011; A35; Watanabe et al., 2022). Из лесной почвы соснового насаждения Самарского леса в Днепропетровской области (Украина) был выделен штамм MZ–Ch5, который соответствовал описанию рода *Parietochloris*, но по ряду морфологических признаков не был идентичен ни одному из уже описанных видов. На морфологическом уровне он отличался размером и формой клеток, формой хлоропласта, количеством образуемых зооспор и др. (A35). Молекулярно-филогенетический анализ с помощью генов 18S rRNA, *rbcL* и исследование предсказанной вторичной структуры ITS2 показали ряд отличительных генетических особенностей и целесообразность описания нового вида – *P. grandis*. В байесовском филогенетическом дереве *P. grandis*, *P. pseudoalveolaris* (T.R. Deason et Bold) Shin Watanabe et G.L. Floyd, штаммы *Parietochloris* sp. CCALA 1082 и CCALA 1084 образовали монофилетическую кладу с типовым видом рода – *P. alveolaris* (Bold) Shin Watanabe et G.L. Floyd. При этом часть видов *Parietochloris* (*P. ovoidea* T.I. Mikhailiuk et E.M. Demchenko, *P. cohaerens* (R.D. Groover et Bold) Shin Watanabe et G.L. Floyd) вошли в состав отдаленной клады *Lobosphaera*. Полученные результаты указали на наличие криптических видов внутри *Parietochloris sensu lato* и на сегодняшний день продолжается поиск диакритических признаков, которые позволят разграничить виды *Parietochloris*. Одной из уже обнаруженных особенностей *Parietochloris sensu stricto* является положение сократительных вакуолей в центральной части зооспор (Mikhailiuk et al., 2003; A35; Watanabe et al., 2022).

Среди цианобактерий порядок Nostocales представляет собой большой и монофилетический кластер видов с неразветвленным, ложно- и истинно разветвленным талломом (Komárek et al., 2014). Таксономическое разнообразие и

филогенетические взаимоотношения внутри этой группы остаются недостаточно изученными. В процессе исследования цианобактериальной флоры Западных Гат (горный массив Сахьядри, Индия) мы выделили новый штамм цианобактерий с *Iningainema*-подобной морфологией (A19). В результате изучения морфологических признаков и филогенетического анализа на основе гена 16S rRNA и в соответствии с Международным кодексом номенклатуры для водорослей, грибов и растений был описан новый вид цианобактерий *I. sahyadrensis* из ранее монотипного рода *Iningainema*. Филогенетический анализ поместил *I. sahyadrensis* в кладу *Iningainema*, семейство Scytonemataceae. Новый штамм сформировал сильно поддерживаемую монофилетическую линию со штаммами типового вида *Iningainema* – *I. pulvinus* В.С. McGregor et Sendall. Лабораторная культура и природные популяции *I. sahyadrensis* отличались от типового вида размерами вегетативных клеток, толщиной оболочки, наличием зернистых полифосфатных включений и вакуолеподобных структур в клетках и типом среды обитания. Сравнение предсказанных вторичных структур 16S rDNA *I. sahyadrensis* и трех клонов *I. pulvinus* показало ряд эволюционных отличий в домене 1 (H8–H10, H17), домене 2 (H21, H22) и домене 3 (H33, H34). Описание нового вида *I. sahyadrensis* показало, что *Iningainema* является не монотипным родом, а его истинное разнообразие еще предстоит выяснить (A19).

Новый вид *Desmonostoc caucasicum* описан из горно-луговой субальпийской почвы Большого Кавказа, Россия (A10). Описание вида было основано на морфологических признаках, филогенетическом анализе на основе гена 16S rRNA и вторичной структуре 16S–23S ITS региона. *D. caucasicum* отличался от других видов рода морфологией колоний, размерами вегетативных клеток и гетероцист, типом местообитания. Матрица эволюционных расстояний, полученная на основании 16S rDNA, показала сходство нового вида на уровне 95,3–97,9% с другими видами *Desmonostoc*. Филогения, полученная методами максимального правдоподобия и Байесовского анализа, подтвердила положение *D. caucasicum* в кладе *Desmonostoc*, семействе Nostocaceae. Новый штамм сформировал независимую линию внутри клады *Desmonostoc* (A10).

Новый вид цианобактерий из рода *Aliinostoc*, *A. vietnamicum*, обнаружен в почве тропического леса национального парка Кат Тьен, Вьетнам (A5). Решение об описании нового вида принято после анализа морфологических признаков, филогении 16S rDNA, вторичной структуры региона 16S–23S ITS. *A. vietnamicum* отличался от других видов рода размерами и формой вегетативных клеток, размерами акинет и гетероцист, наличием зернистых полифосфатных включений в цитоплазме вегетативных клеток. Также от других представителей *Aliinostoc* новый вид отличался способностью образовывать газовые вакуоли только в клетках молодых подвижных гормогоний. В зрелых вегетативных клетках газовые вакуоли отсутствовали как в природных образцах, так и лабораторных культурах, выращенных на жидких и агаризованных питательных средах. Матрица эволюционных расстояний, основанная на генах 16S rRNA, показала сходство 96,2–98,2% с другими последовательностями *Aliinostoc*. Филогения, полученная методами максимального правдоподобия и байесовского анализа, указала на независимое положение *A. vietnamicum* внутри клады *Aliinostoc*, семейства Nostocaceae (A5).

При описании новых видов *A. vietnamicum* и *D. caucasicum* в качестве одного из критериев для таксономической идентификации цианобактерий успешно использованы матрицы расчета процентного сходства (*p*-расстояния), созданные путем объединения нуклеотидных последовательностей спиралей ITS D1–D1', Vох–В и V3

(A5; A10). Исключение из анализа гетерогенных спейсеров, расположенных между спиралью D1–D1', Vох–V и V3, позволило достичь большей стабильности рассчитываемого *p*-расстояния вне зависимости от способа выравнивания матрицы. Дальнейшее применение предложенного метода будет способствовать стандартизации используемого таксономически значимого межвидового и внутривидового диапазона *p*-расстояния ITS у цианобактерий.

Наиболее распространенным методом идентификации диатомовых водорослей пока является использование морфологических характеристик их кремнеземного панциря. При этом ДНК-штрихкодирование является альтернативой микроскопированию, а привлечение высокопроизводительного секвенирования позволяет проводить быстрый анализ многих образцов окружающей среды с меньшими затратами времени по сравнению с изучением морфологии. Успешное использование ДНК-штрихкодов связано с применением баз данных нуклеотидных последовательностей. На сегодняшний день существует несколько курируемых ДНК-библиотек для протистов, однако долгое время ни одна из них не была посвящена диатомовым водорослям. В составе международного коллектива мы приняли участие в создании первой библиотеки с открытым доступом *Diat.barcode*, которая функционирует с 2012 г. и посвящена диатомовым водорослям (A28). *Diat.barcode* – это первая в мире справочная библиотека, посвященная диатомовым водорослям с возможностью работы на уровне рода и вида ([https://www6.inra.fr/cartel-collection\\_eng/Barcoding-database](https://www6.inra.fr/cartel-collection_eng/Barcoding-database)). *Diat.barcode* оперирует, в первую очередь, нуклеотидными последовательностями хлоропластного гена *rbcL* и в меньшей степени ядерными генами 18S rRNA, 28S rRNA и внутренним транскрибируемым спейсером ITS, митохондриальным геном *cox1*. На сегодняшний день библиотека только для гена *rbcL* содержит 3482 последовательности, представляющих диатомовую флору Европы, Северной Америки и Азии. В ходе разработки *Diat.barcode* нами непосредственно была внесена информация о нуклеотидных последовательностях генов *rbcL* и 18S rRNA диатомовых водорослей из озера Байкал, водоемов Вьетнама, Индонезии, Монголии и Японии (A28).

Использование интегративного подхода при изучении видового богатства микроводорослей и цианобактерий разнотипных экосистем Евразии позволило выявить ряд новых закономерностей в соотношении молекулярных и морфологических данных у разных групп микроорганизмов. Показано, что роды диатомовых водорослей *Craticula*, *Dorofeyukea*, *Fistulifera*, *Karayevia*, *Madinithidium*, *Parlibellus*, *Prestauroneis*, *Schizostauron* и *Stauroneis* принадлежат к семейству Stauroneidaceae. На основании анализа морфологии и ультраструктуры створок диатомовых водорослей из родов *Dorofeyukea*, *Gogorevia*, *Hantzschia*, *Karayevia* и *Madinithidium* установлено, что ключевым диакритическим признаком, помимо формы створки, количества штрихов и ареол, относится строение порового аппарата и структура шва. Установлено, что для разграничения представителей *Parietochloris sensu lato* (Trebouxiophyceae) важным признаком является положение сократительных вакуолей у зооспор. При описании новых таксонов цианобактерий наличие зернистых полифосфатных включений в цитоплазме и способность образовывать газовые вакуоли коррелировало с выделением новых филогенетических линий внутри Nostocales. В качестве одного из критериев для таксономической идентификации цианобактерий предложено использовать матрицы расчета процентного сходства (*p*-расстояния), созданные на основе объединенных нуклеотидных последовательностей спиралей ITS: D1–D1', Vох–V и V3. На примере

созданной справочной библиотеки Diat.barcode показана актуальность поддержания, обновления и дополнения референсных баз данных по нуклеотидным последовательностям для успешного решения вопросов ДНК-штрихкодирования.

### **Глава 3. Изучение состава жирных кислот, пигментов микроводорослей, цианобактерий и факторов, влияющих на их содержание**

#### **3.1. Скрининг состава жирных кислот в биомассе микроводорослей и цианобактерий**

Микроводоросли являются ценным природным ресурсом для производства различных продуктов с добавленной стоимостью (Maltsev et al., 2017). Как свидетельствует анализ публикаций (Borowitzka, 2013; Barkia et al., 2019), наиболее часто извлекаемыми из водорослей соединениями с высоким потенциалом коммерциализации являются липиды (Chisti, 2007; Mata et al., 2010). На втором месте – жирные кислоты (Borowitzka, 2013; Sathasivam et al., 2019), при этом профили жирных кислот уникальны для конкретных классов липидов. Насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты преимущественно содержатся в триглицеридах, полиненасыщенные – в полярных липидах (Harwood, 2019; Xin et al., 2019). Микроводоросли, синтезирующие липиды в большом количестве, считаются ценным природным сырьем для производства биотоплива третьего поколения, пищевых и кормовых добавок, детского питания, кормов для аквакультуры, фармацевтических и косметических препаратов и др. (Shaikh et al., 2019; Levasseur et al., 2020; Peltomaa, Taipale, 2020).

В результате анализа обширной информации о разнообразии жирнокислотного состава микроводорослей и цианобактерий, полученной в результате собственных исследований и представленной в научных публикациях, был сформирован список из 135 жирных кислот (A1). В целом профиль жирных кислот водорослей очень разнообразен (Рис. 6). С учетом длины углеводородной цепи, ее строения и наличия заместителей они распределяются на несколько групп: с четным количеством атомов углерода в цепи – 81, с короткой цепью (6–8 атомов углерода) – 2, средней (10–14 атомов углерода) – 14, длинной (16–18 атомов углерода) – 28, очень длинной цепью (более 20 атомов углерода) – 37, с нечетным количеством атомов углерода – 33, с разветвленной углеводородной цепью и дополнительными функциональными группами – 21 жирная кислота. Среди жирных кислот микроводорослей есть как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты с различным количеством двойных связей: насыщенные – 19, мононенасыщенные – 26, полиненасыщенные – 68. Важной особенностью жирнокислотного профиля микроводорослей является наличие омега-3 и омега-6 жирных кислот, а также незаменимых линолевой и линоленовой, условно незаменимых арахидоновой, докозагексаеновой, эйкозапентаеновой кислот (Harwood, 2019; A1).

Утверждение о специфичности состава и комбинации определенных жирных кислот в пределах филогенетически обособленных таксономических групп микроводорослей в целом подтверждается. Однако в некоторых случаях, особенно на уровне таксонов низшего ранга, вариабельность состава профиля жирных кислот достаточно высока, что снижает однозначность его использования в качестве хемотаксономического маркера и требует дальнейших исследований. Как свидетельствует проведенный анализ и наши отдельные работы, при оценке особенностей жирнокислотного состава биомассы водорослей и цианобактерий необходимо учитывать экологические, географические, хорологические аспекты

происхождения штаммов (A35; A34; A32; A29; A26; A18; A14; A6; A5; A1). Также отмечаемая вариабельность профиля жирных кислот микроводорослей на уровне тех или иных таксонов связана с различиями в условиях их культивирования (A35; A34; A29; A26; A18; A14). Результаты указывают на то, что состав жирных кислот микроводорослей характеризуется разнообразием отклика на действие ключевых абиотических факторов. Принимая это во внимание, весьма важными задачами будущих исследований является не только получение более полной информации о разнообразии жирных кислот микроводорослей и их количественном содержании, но и уточнение диапазона вариабельности состава жирных кислот в зависимости от изменения условий существования штамма, состава биомаркерных жирных кислот и характерных для разных таксономических групп профилей жирных кислот. В свою очередь, это позволит оценить возможность использования профиля жирных кислот для идентификации таксонов в соответствии с технологиями штрихкодирования.



Рисунок 6. Схема разнообразия жирных кислот в биомассе микроводорослей и цианобактерий и основные направления их практического использования (A1).

Согласно современным концепциям при поиске высокопродуктивных и ценных с точки зрения биотехнологических производств штаммов микроводорослей особое внимание следует уделять представителям из филогенетических линий с уже известными продуцентами важных соединений (Galloway, Winder, 2015; Neofotis et al., 2016). Поэтому нами было исследовано содержание липидов и состав жирных кислот у ряда штаммов из созданной коллекции культур водорослей и цианобактерий биотехнологического назначения, представляющих новые виды, а также новые штаммы известных видов зеленых микроводорослей: *Bracteacoccus bullatus* (A26;

A34), *Coccomyxa elongata* (A29), *Coelastrella multistriata* (A14; Maltseva et al., 2022), *Nephrochlamys yushanlensis* (A18), *Parietochloris grandis* (A35), *Pseudomuriella engadinensis* (A32); диатомовых из рода *Pinnularia* (A6) и цианобактерий из рода *Aliinostoc* (A5).

Описанный нами вид *Nephrochlamys yushanlensis* (Рис. 7) был использован в экспериментах с культивированием при отсутствии фосфатов и нитратов в питательной среде ВВМ для оценки изменений накопления биомассы, содержания липидов, триглицеридов и состава жирных кислот (A18). Высушенная биомасса исследованного штамма MZ–Ch62 при одновременной депривации нитратов и фосфатов составила 1,7 г/л, что значительно ниже, чем 2,4 г/л, наблюдаемых во время культивирования на стандартной среде ВВМ.

Нитратное и фосфатное голодание стимулировало накопление липидов по сравнению с условиями без стрессирования (контроль). Наибольшее увеличение общего содержания липидов, достигшее 58,7% сухой биомассы на 15-й день культивирования, происходило при депривации нитратов. При этом у большинства зеленых водорослей-продуцентов среднее содержание липидов составляет около 25,5% сухой биомассы при нормальных условиях, а в условиях стресса может увеличиваться до 45,7% (Wang et al., 2017; Vermejo et al., 2018; A29; A34). Значительное увеличение количества триглицеридов по сравнению с контролем (16,9%) наблюдалось в условиях отсутствия фосфатов и нитратов (до 23,7% и 21,7% соответственно).

Доминирующими жирными кислотами при культивировании на стандартной среде ВВМ, а также при отсутствии фосфатов и нитратов были олеиновая (49,8–64,1%), пальмитиновая (21,1–22,7%) и линолевая (8,6–10,3%). Депривация фосфатов, а также одновременное отсутствие нитратов и фосфатов, способствовало появлению  $\alpha$ -линоленовой (1,5–4,1%) и стеариновой (1,0–1,8%) кислот. В целом полученные профили жирных кислот показали, что штамм MZ–Ch62 характеризуется более высоким содержанием насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот (до 88,9% общего количества жирных кислот в условиях отсутствия нитратов) по сравнению с другими известными штаммами Selenastraceae, в профилях жирных кислот которых преобладают омега-3 и омега-6 жирные кислоты (Рис. 7). Это, наряду с сопоставимой с другими штаммами скоростью накопления биомассы, позволяет предположить, что этот штамм может быть интересен для производства биодизельного топлива (A18).

Был проведен ряд экспериментов с различными концентрациями фосфатов и нитратов в питательной среде для оценки изменений накопления биомассы, содержания белков, углеводов и профиля жирных кислот у нового вида *Parietochloris grandis* (A35). Максимальные значения сухой биомассы штамма *P. grandis* MZ–Ch5 (2,6 г/л) были получены в условиях с низкой концентрацией нитратов (5,9 ммоль) в питательной среде. Более низкое содержание биомассы (2,2 г/л) отмечено в стандартной среде BG-11 (17,6 ммоль нитратов). В экспериментах с отсутствием в среде нитратов, фосфатов и одновременно нитратов и фосфатов значения сухой биомассы были в диапазоне 1,6–1,8 г/л. Биомасса штамма *P. grandis* MZ–Ch5, выращенного на стандартной среде BG-11, содержала 45,6% углеводов и 20,4% белков в сухой массе. Максимальные значения продуктивности сухой биомассы, белка и жирных кислот составляли 164, 30 и 41 мг/л×день.

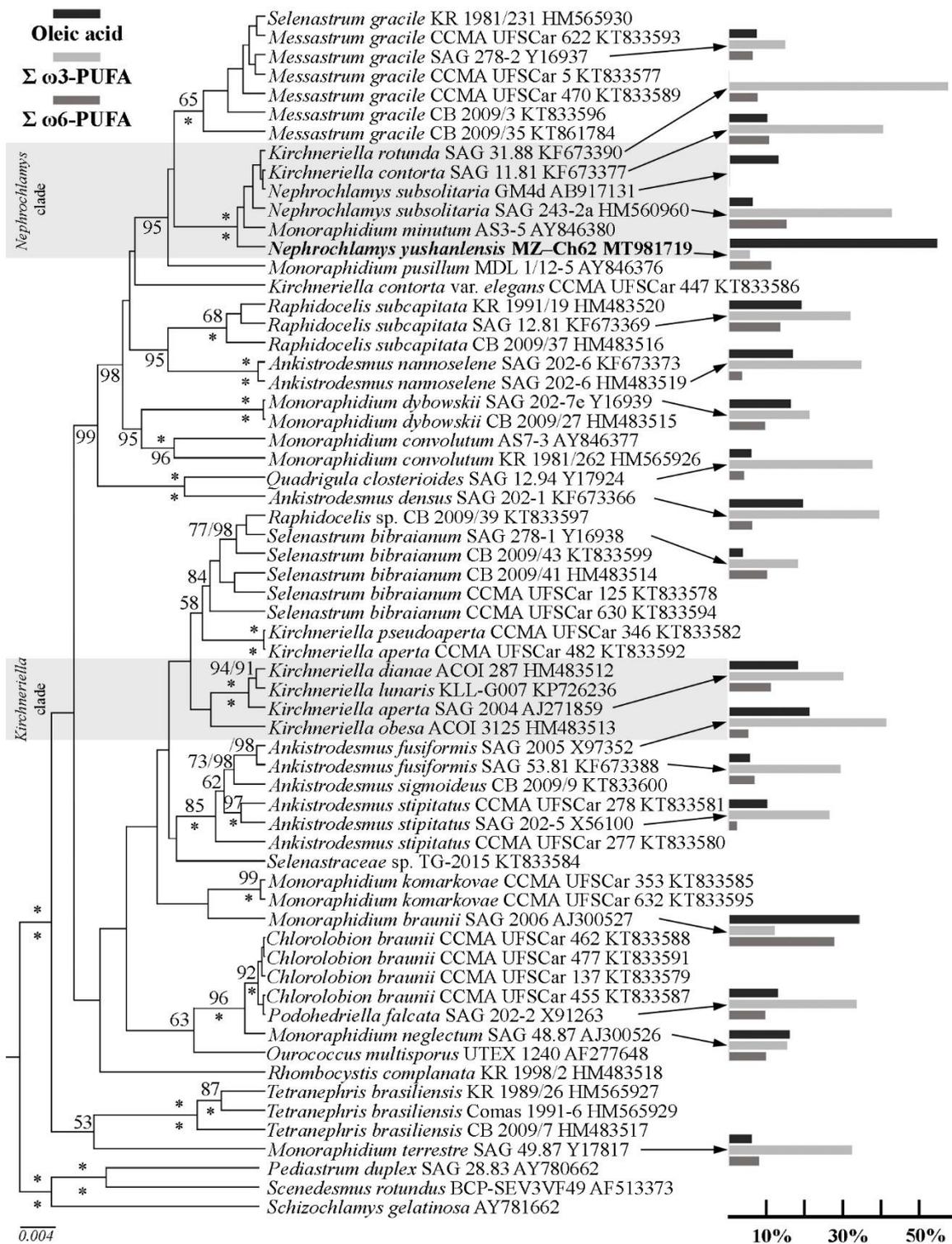


Рисунок 7. Байесовское дерево для *Nephrochlamys yushanlensis* на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей гена 18S rRNA длиной 1770 п.н. 63 штаммов Selenastraceae. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<90 не указаны). \* 100% статистическая поддержка. Стрелками указано содержание олеиновой жирной кислоты (темно-серый цвет), омега-3 (светло-серый цвет) и омега-6 (серый цвет) жирных кислот (% общего содержания жирных кислот) при культивировании без стрессирования (Lang et al., 2011; Hung, 2017; A18).

Доминирующими жирными кислотами при культивировании на стандартной среде BG-11, а также при концентрациях фосфатов от 0,22 до 2 мМ, были линолевая (24–25%), пальмитиновая (12–14%), линоленовая (9–12%) и олеиновая (7–11%). Профили жирных кислот и их количество значительно отличались при различных комбинациях дефицита питательных веществ. Условия культивирования с отсутствием нитратов и одновременным отсутствием нитратов и фосфатов в среде BG-11 способствовали увеличению количества жирных кислот в 3 раза по сравнению с контролем. Наибольший диапазон колебания содержания обнаружен для олеиновой (9–46%) и линоленовой (2–13%) кислот. Содержание арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот колебалось от 3,5 до 4,5% и от 0,7 до 0,8% соответственно. Процентное содержание арахидоновой кислоты было самым высоким при стандартной концентрации нитратов в среде BG-11, а самым низким – при отсутствии фосфатов и нитратов. Известно, что некоторые штаммы *Parietochloris* характеризуются высоким содержанием арахидоновой кислоты, например, 30–34% общего содержания жирных кислот у штаммов *Parietochloris* sp. CCALA 1084 и CCALA 1082 (Řezanka et al., 2017). Несмотря на филогенетическое родство с CCALA 1084 и CCALA 1082, у штамма *P. grandis* MZ–Ch5 не отмечено высокого содержания арахидоновой кислоты. В тоже время *P. grandis* накапливал линолевоую кислоты в два раза больше, чем штаммы *Parietochloris* sp. CCALA 1084 и CCALA 1082. Исследованный состав жирных кислот *P. grandis* MZ–Ch5 при разных условиях культивирования, с одной стороны, подчеркивает специфичность жирнокислотного профиля каждого конкретного штамма, а с другой – актуализирует биотехнологическое использование данного штамма в качестве потенциального продуцента незаменимой линолевоую кислоты.

Из вскрышных пород промышленного отвала известнякового месторождения, расположенного в Тульской области, выделен штамм одноклеточной зеленой водоросли *Coelastrella multistriata* – первой находки данного вида во флоре России (A14; Maltseva et al., 2022). Предыдущий опыт культивирования различных штаммов *Coelastrella* Chodat показал их способность продуцировать биомассу в пределах 1,1–1,9 г/л (Abe et al., 2007; Minyuk et al., 2016, 2017; Lage et al., 2019). При этом наивысший показатель сухой биомассы отмечен для штамма *C. striolata* var. *multistriata* во время выращивания в тонкой пробирке в течение 30 суток с освещением 65 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с на среде ВВМ с концентрацией нитратов 5,9 ммоль (Abe et al., 2007). Следовательно, способность нашего штамма MZ–Ch23 продуцировать биомассу в диапазоне 0,9–1,4 г/л в целом характерна для большинства штаммов *Coelastrella*, включая *C. rubescens* IPPAS H-350 (= CCALA 475) (Minyuk et al., 2016, 2017) и *Coelastrella* sp. (Lage et al., 2019).

Штамм *C. multistriata* MZ–Ch23 оказался высокочувствительным к изменениям условий культивирования, связанных с нитратным и фосфатным голоданием. Несмотря на вызванное стрессом снижение содержания биомассы, количество накопленных липидов в условиях ВВМ-N-P у штамма *C. multistriata* было максимальным (57,2% сухой биомассы или 639,8 мг/л культуры) и превышало значения, полученные без стрессирования (27,0% или 349,9 мг/л). Нитратное голодание приводило к 1,7-кратному увеличению общего содержания липидов (до 45,9%), а отсутствие только фосфатов в питательной среде ВВМ оказывало минимальное влияние на содержание липидов (37,1%). В целом, полученные результаты накопления липидов в культуре превышают известные значения для большинства штаммов *Coelastrella*. Ранее высокое содержание липидов (57,0%) было зарегистрировано для штамма *C. rubescens* IPPAS H-350 в условиях повышения кислотности в среде ВВМ до

pH 5 (Minyuk et al., 2016) или постоянного барботирования воздухом (Minyuk et al., 2017). Самый высокий выход триглицеридов (159,9 мг/л) для штамма MZ–Ch23 был получен в среде ВВМ-N-P, что в 1,5 раза выше по сравнению со стандартной средой ВВМ. Использование различных режимов нитратного и фосфатного питания, изменение времени культивирования (25 и 60 дней) сопровождались перестройкой профиля жирных кислот у *C. multistriata* – стрессирование условий культивирования в первую очередь отражалось на количестве пальмитиновой, олеиновой, линолевой и  $\alpha$ -линоленовой жирных кислот.

Проведенные эксперименты по выращиванию и стрессированию *C. multistriata* MZ–Ch23 показали наличие нескольких стратегий культивирования, которые могут быть использованы в биотехнологии. Длительное культивирование (в течение 60 дней) способствовало накоплению биомассы на уровне 1,4 г/л с высоким содержанием липидов (35,4% сухой биомассы) и жирных кислот (38,8% или 538,2 мг/л), в первую очередь полиненасыщенных. При этом 60-дневная культура имела наибольшее разнообразие и количество жирных кислот с очень длинной цепью (более 20 атомов углерода). Культивирование в течение 25 дней на среде с нитратами и фосфатами позволило получить близкие значения накопленной биомассы (1,3 г/л) с высоким содержанием омега-3 жирных кислот (58% общего количества жирных кислот), особенно  $\alpha$ -линоленовой (38,1%). Культивирование в условиях одновременного отсутствия нитратов и фосфатов в среде ВВМ стимулировало максимальное накопление липидов (57,2% сухой биомассы), при этом преобладали мононенасыщенные жирные кислоты (34,9%). Следовательно, стратегии длительного и 25-дневного выращивания *C. multistriata* на обогащенной питательными веществами среде могут использоваться для получения биомассы с высоким потенциалом использования в пищевой и фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и аквакультуре. Количество насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот (61,1% или 400,0 мг/л) при выращивании без нитратов и фосфатов в среде позволяет рассматривать биомассу штамма MZ–Ch23 как ценное сырье для производства биотоплива (A14; Maltseva et al., 2022).

Для новых штаммов зеленой водоросли *Bracteacoccus bullatus* (штаммы MZ–Ch11, MZ–Ch32) были исследованы характеристики темпов роста и накопления липидов (A34; A26). Оба штамма демонстрировали близкие результаты по накоплению биомассы: 2,1–2,4 г/л в течение 14–15 дней культивирования. Подобные значения были ранее получены для штамма АСКУ 506-06 (=SAG 221-1) *Bracteacoccus minor* (Schmidle ex Chodat) Petrová – 2,5 г/л сухой биомассы с содержанием липидов на уровне 53–63% при выращивании на среде 3N ВВМ в течение 16 дней (Minyuk et al., 2015). При этом среди штаммов *Bracteacoccus* есть значительно менее продуктивные, например, количество биомассы у штамма MIC-G16 за 18 дней культивирования на модифицированной среде ВВМ (с добавлением глюкозы в концентрации 20 г/л) составило 0,9 г/л с содержанием липидов 11,1% (Ratha et al., 2012). В тоже время десятикратное снижение концентрации питательных веществ в среде WC приводило к незначительному уменьшению накопления биомассы у нашего штамма MZ–Ch11 – всего до 1,7 г/л.

Для штамма MZ–Ch32 при культивировании на среде ВВМ отмечено содержание липидов на уровне 55,8%. При сопоставимом содержании нитратов в среде культивирования (WC 10N) в биомассе штамма MZ–Ch11 содержание липидов было 17% и увеличивалось до 59% при 10-кратном уменьшении концентрации нитратов в среде WC. Наибольшая объемная продукция липидов у штамма MZ–Ch11 наблюдалась

при концентрации 1 мМ нитратов и 0,05 мМ фосфатов. Таким образом, два штамма одного вида продемонстрировали различную реакцию на изменение содержания питательных веществ в контексте накопления липидов.

В целом, общее количество насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в биомассе штаммов *B. bullatus* близко к значениям растительных масел, которые используются в качестве исходного сырья для производства биодизеля. По сравнению с другими штаммами *Bracteacoccus*, профиль жирных кислот *B. bullatus* MZ-Ch11 содержал значительно больше олеиновой жирной кислоты (до 63,8% общего содержания жирных кислот). Биомасса штамма MZ-Ch32 также была богата олеиновой кислотой (43,2%), однако этот показатель в 1,5 раз ниже, чем у MZ-Ch11 (Рис. 8). Специфической чертой штамма MZ-Ch32 являлось высокое содержание гексадекадиеновой (12,5%) и линолевой (23,8%) кислот, что в 2,5 и 1,7 раза больше, чем у *B. bullatus* MZ-Ch11.

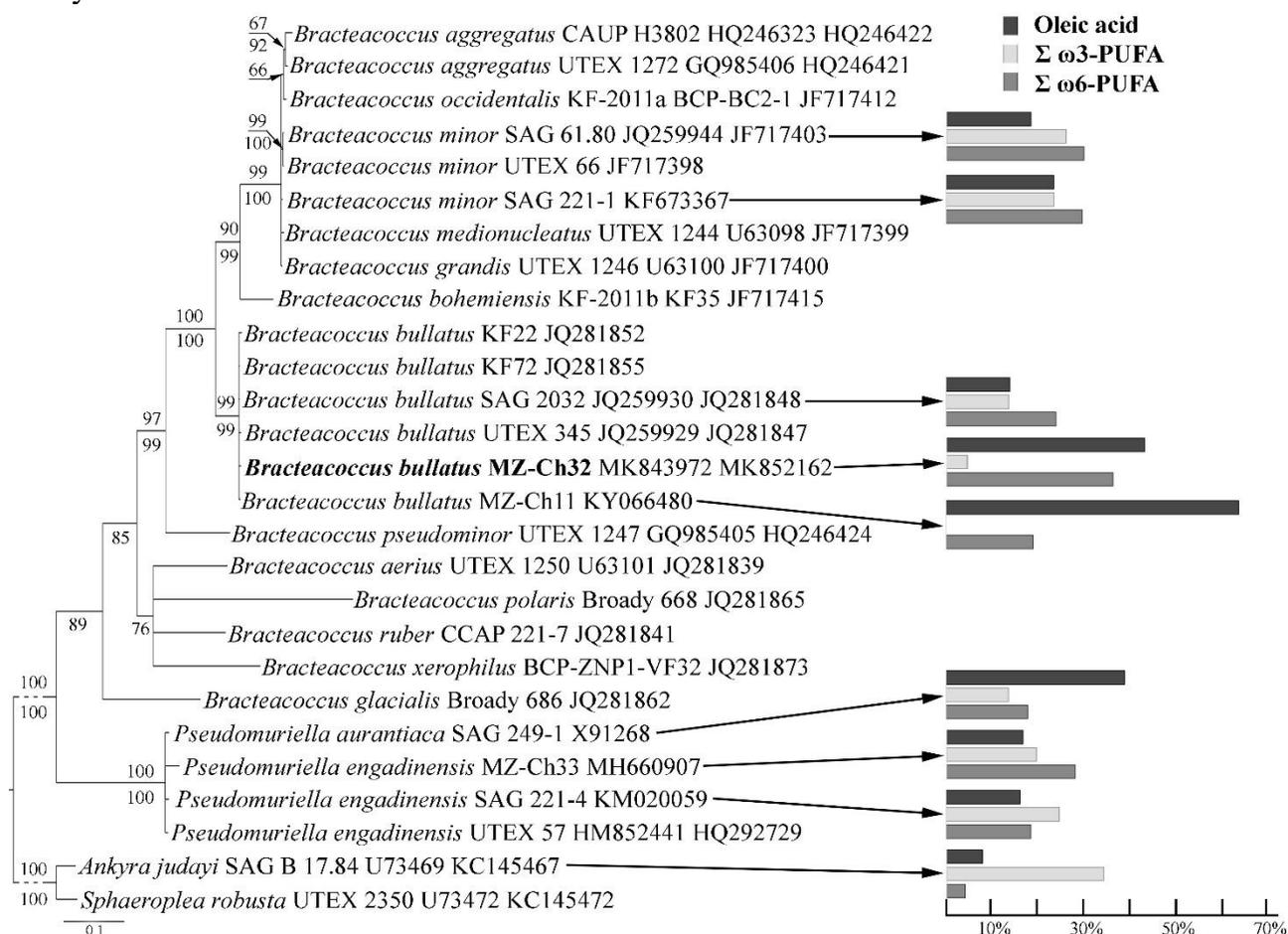


Рисунок 8. Байесовское филогенетическое дерево для штаммов *Bracteacoccus bullatus* MZ-Ch11 и MZ-Ch32 на основе выравнивания нуклеотидных последовательностей варибельного участка V4 гена 18S rRNA и региона ITS1–5,8S rDNA–ITS2 суммарной длиной 1100 п.н. 27 штаммов Sphaeropleales. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<75 не указаны). Стрелками указано содержание олеиновой жирной кислоты (темно-серый цвет), омега-3 (светло-серый цвет) и омега-6 (серый цвет) жирных кислот (% общего содержания жирных кислот) при культивировании без стрессирования (Lang et al., 2011; A34; A26).

У штамма MZ–Ch11 во время культивирования на среде WC омега-3 жирные кислоты отсутствовали, а содержание омега-6 составило 19%. Манипуляции с концентрацией соединений азота и фосфора в среде привели к появлению омега-3 на уровне 0,4% и увеличению количества омега-6 жирных кислот до 34,5% (A34). Штамм MZ–Ch32 также отличался низким содержанием омега-3 жирных кислот – 5,4%, однако по количеству омега-6 он превзошел все известные штаммы *Bracteacoccus* – 36,3% общего количества жирных кислот (Рис. 8). Учитывая обнаруженные биохимические характеристики, штаммы *B. bullatus* MZ–Ch11, MZ–Ch32 могут рассматриваться как потенциальные продуценты омега-6 жирных кислот.

Специфические особенности накопления липидов и изменения состава жирных кислот при смене условий культивирования могут быть связаны с происхождением штаммов *B. bullatus*. Штаммы MZ–Ch11 и MZ–Ch32 выделены из местообитаний, отличающихся содержанием питательных веществ. Природные условия обитания штамма MZ–Ch11 – почва с содержанием гумуса 2,6% (A34), а штамма MZ–Ch32 – лесная подстилка с содержанием гумуса 12,5–20,5% (A26). Можно предположить, что данные штаммы характеризуются различными адаптациями к содержанию питательных веществ в среде обитания и отличаются стратегиями метаболизма для преодоления стрессовых ситуаций в связи с их избытком или недостатком.

Был проведен ряд экспериментов с различными концентрациями фосфатов и нитратов в питательной среде ВВМ для оценки изменений в профиле жирных кислот и продуктивности биомассы у нового пресноводного штамма *Coccomyxa elongata* MZ–Ch64 (A29). Профиль жирных кислот и их количество значительно отличалось при изменении состава питательной среды. Наибольшее накопление сухой биомассы *C. elongata* MZ–Ch64 (0,9 г/л культуры) было отмечено на среде ВВМ (контроль) через 15 дней культивирования. В условиях отсутствия фосфатов в среде сухая масса составляла 0,8 г/л, а нитратов – 0,7 г/л. При одновременном отсутствии нитратов и фосфатов сухая биомасса была 0,6 г/л, что на 27% ниже, чем в контроле. При этом стрессирование изменением состава питательной среды имело иное влияние на накопление липидов у *C. elongata*. В условиях стандартной среды ВВМ содержание общих липидов было наименьшим и достигало 0,2 г/л культуры (или 24% сухой биомассы). Удаление нитратов из среды приводило к увеличению общего содержания липидов до максимального значения – 0,3 г/л (49% сухой биомассы). Культура, выращенная в условиях отсутствия фосфатов, содержала 37% липидов. Полученные нами результаты сопоставимы с другими ценными штаммами *Coccomyxa* Schmidle. Так сухая биомасса *C. onubensis* Garbayo et al. ex Fuentes, Huss, Montero, Torronteras, Cuaresma, Garbayo et Vilchezunder содержала 48,7% липидов при постоянном освещении культуры (Bermejo et al., 2018), а штамм C-169 (=NIES 2166) *C. subellipsoidea* E. Acton накапливал 48,8–50,5% липидов в условиях азотного голодания (Wang et al., 2017).

Доминирующей жирной кислотой при культивировании штамма *C. elongata* MZ–Ch64 на стандартной среде ВВМ, а также в условиях отсутствия фосфатов, была олеиновая кислота (до 48–54,6% общего содержания жирных кислот). Отсутствие только нитратов, а также отсутствие как нитратов, так и фосфатов, приводило к увеличению содержания пальмитиновой (до 24,7–25,6%), цис-7-гексадеценовой (до 14,8%) и  $\alpha$ -линоленовой (до 9,1–10,1%) кислот по сравнению с культивированием на стандартной среде ВВМ. Наибольший диапазон изменения содержания обнаружен для олеиновой кислоты (31,9–54,6%). Специфической особенностью профиля жирных кислот штамма *C. elongata* MZ–Ch64 было высокое содержание цис-7-гексадеценовой кислоты – в диапазоне 5,7–14,8% с максимумом в условиях отсутствия нитратов в

среде ВВМ. При этом у других известных штаммов *Coccoloba* данная омега-9 жирная кислота не обнаружена или ее содержание не превышает 1% (Lang et al., 2011; A29). Известно, что цис-7-гексадеценовая кислота по полезным свойствам не уступает омега-3 докозагексаеновой и эйкозапентаеновой жирным кислотам, а в первую очередь – характеризуется высокой противовоспалительной активностью как *in vitro*, так и *in vivo* (Guijas et al., 2016). Таким образом, штамм *C. elongata* MZ–Ch64 можно рассматривать как потенциальный продуцент олеиновой или одновременно цис-7-гексадеценовой и  $\alpha$ -линоленовой кислот для биотехнологического использования (A29).

Также было изучено содержание липидов и состав жирных кислот нового штамма MZ–Ch33 *Pseudomuriella engadinensis* – первой находки данного вида во флоре водорослей Украины (A32). Содержание суммарных липидов составило 87,9 мг/г сухой биомассы. Анализ состава жирных кислот исследованного штамма показал, что основными были пальмитиновая, гексадекадиеновая, ругановая, олеиновая, линолевая и  $\alpha$ -линоленовая кислоты – на их долю приходилось 82,4% общего содержания жирных кислот. При этом от близкородственных штаммов *P. engadinensis* SAG 221-3 и SAG 221-4 исследованный штамм отличался большим содержанием пальмитиновой жирной кислоты – 20,1% по сравнению с 11,3% у штамма SAG 221-3 и 10,1% у SAG 221-4. Также отмечено увеличенное количество незаменимой для животных линолевой жирной кислоты – 17,7% у штамма MZ–Ch33 при 11,6% и 12,0% у SAG 221-3 и SAG 221-4 соответственно (Lang et al., 2011). В целом штамм *P. engadinensis* MZ–Ch33 характеризовался высоким содержанием омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот – 20,2% и 28,6%. Использование в биотехнологическом направлении штамма MZ–Ch33 может быть связано именно с этой группой биопродуктов, например при создании подкормок для животноводства и аквакультуры (A32).

*Pinnularia* – это один из самых многочисленных родов диатомовых водорослей (Куликовский и др., 2016). Анализ современной литературы показывает, что на сегодняшний день род включает 1432 видовых и 1476 внутривидовых эпитета, из которых 1403 таксономически принятые (Guiry, Guiry, 2022). Представители *Pinnularia* повсеместно встречаются в пресных водах и почвах, достигая наибольшего разнообразия в тропиках. Виды *Pinnularia* часто упоминают как наиболее разнообразную группу в почвенных сообществах водорослей, так как некоторые из них относятся к космополитам (Foets et al., 2021). При этом состав жирных кислот в клетках почвенных диатомовых водорослей остается практически не изученным. Имеющиеся работы в основном посвящены морским видам диатомовых, особенно *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (Arao, Yamada, 1994) и *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.A. Fryxell et Hasle (Marella, Tiwari, 2020), биомасса которых богата пальмитиновой, пальмитолеиновой и эйкозапентаеновой кислотами.

Исследование состава жирных кислот в биомассе почвенных видов *Pinnularia* проводили на примере 8 штаммов, представляющих 6 новых таксонов *P. insolita*, *P. microgibba*, *P. minigibba*, *P. ministomatophora*, *P. paradubitabilis* и *P. vietnamogibba* из тропических лесов Вьетнама (A6). Установлено, что доминирующими жирными кислотами в биомассе данных водорослей, культивируемых на среде Waris-H+Si, были насыщенные стеариновая (36,0–64,4%) и пальмитиновая (20,1–30,4%), а также мононенасыщенная пальмитолеиновая (до 20,8%) кислоты. Небольшие количества насыщенной арахидиновой кислоты ( $\leq 1,0\%$ ) были обнаружены у всех штаммов, тогда как *P. vietnamogibba*, *P. minigibba* и *P. paradubitabilis* также продуцировали длинноцепочечную насыщенную бегеновую кислоту ( $\leq 1,0\%$ ). Длинноцепочечная омега-3 полиненасыщенная эйкозапентаеновая кислота присутствовала

исключительно в биомассе *P. insolita* (1,1%). Следовательно, несмотря на то, что исследованные штаммы *Pinnularia* относятся к разным видам, общие тенденции состава жирных кислот у них сохраняются. Клетки данных штаммов накапливают большие концентрации только насыщенных (с максимумом 92,7% у штамма *P. minigibba* VP284) или одновременно насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот (с наибольшей суммой у штаммов *P. minigibba* VP284 и *P. vietnamogibba* VP294). Подобный состав жирных кислот отмечен для других почвенных штаммов диатомовых водорослей, например, у штамма SAG 1052-3a *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith доминантными были насыщенные миристиновая (26,0%) и пальмитиновая (24,5%) кислоты, а также мононенасыщенная пальмитолеиновая (27,2%) кислота, при этом полиненасыщенные жирные кислоты отсутствовали (Lang et al., 2011).

Показательным является сопоставление жирнокислотных профилей наших штаммов с аналогичными данными для пеннатных диатомовых водорослей, выделенных из пресноводных и солоноватоводных водоемов. Пресноводные штаммы SAG 1032-1 *Gomphonema parvulum* (Kützing) Kützing и SAG 1050-3 *Fistulifera pelliculosa* (Kützing) Lange-Bertalot характеризовались высокими концентрациями насыщенной пальмитиновой (36,0 и 15,5%), мононенасыщенной пальмитолеиновой (31,1 и 50,2%) кислот (Lang et al., 2011). Также штамм *Gomphonema parvulum* SAG 1032-1 накапливал до 8% полиненасыщенной длинноцепочечной омега-6 аденовой кислоты. При сравнении профилей жирных кислот исследуемых штаммов *Pinnularia* с профилями штаммов, выделенных из солоноватоводных водоемов отмечено, что, несмотря на доминирование мононенасыщенных жирных кислот, солоноватоводные штаммы также запасают высокие концентрации длинноцепочечных полиненасыщенных кислот. Так в биомассе штамма SAG 1052-52 *Nitzschia frustulum* (Kützing) Grunow обнаружено до 23% пальмитолеиновой и до 47,7% пальмитиновой кислот, а среди полиненасыщенных доминантой была аденовая кислота, 14,3% (Lang et al., 2011). Биомасса штамма RBG1 *Sellaphora pupula* (Kützing) Mereschkovsky содержала 29,3% пальмитолеиновой и 16,4% пальмитиновой кислот, а среди длинноцепочечных лидером была эйкозатетраеновая жирная кислота – 31,2% (Moreno et al., 2013). Специфической чертой морских штаммов *Phaeodactylum tricorutum* является способность синтезировать большие концентрации (более 23%) эйкозапентаеновой кислоты (Lang et al., 2011).

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что разнообразие жирных кислот у диатомовых водорослей также существенно зависит от происхождения штаммов. Профили жирных кислот у штаммов диатомовых, выделенных из солоноватоводных местообитаний, характеризуются большими концентрациями длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот. Клетки пресноводных штаммов запасают как насыщенные и мононенасыщенные, так и полиненасыщенные жирные кислоты. У тропических почвенных штаммов *Pinnularia* среди жирных кислот преобладают насыщенные и мононенасыщенные кислоты с длинной цепью (16–18 атомов углерода) (А6). Следовательно, при дальнейшем исследовании данных штаммов стоит делать акцент на возможности их практического использования в качестве продуцентов пальмитиновой и пальмитолеиновой жирных кислот, которые ценятся при производстве биотоплива (Knothe, 2014).

Впервые определен состав жирных кислот цианобактерий из рода *Aliinostoc* (А5). Был проанализирован профиль жирных кислот нового вида *Aliinostoc vietnamicum* на разных фазах роста во время культивирования на среде Z8. За время экспоненциальной фазы роста (15 дней культивирования) штамм *A. vietnamicum* VP225 нарастил 1,2 г/л

сухой биомассы. Увеличение продолжительности роста культуры до стационарной фазы (25 дней культивирования) способствовало повышению накопления сухой биомассы до 1,8 г/л. Наибольший выход жирных кислот (427,2 мг/л) наблюдался во время экспоненциального роста. При этом преобладающими были  $\alpha$ -линоленовая (37,8% общего содержания жирных кислот), пальмитолеиновая (16,7%) и пальмитиновая (13,9%) кислоты. Переход культуры на стационарную фазу стимулировал увеличение содержания пальмитиновой (до 22,7%) и стеариновой (до 20,3%) кислот по сравнению с экспоненциальным ростом. При этом содержание  $\alpha$ -линоленовой кислоты уменьшалось почти в 1,4 раза. В целом спектр жирных кислот *Aliinostoc vietnamicum* во время экспоненциального роста характеризовался повышенным содержанием мононенасыщенных и полиненасыщенных жирных кислот: 21% и 52% соответственно. Переход культуры на стационарную фазу сопровождался увеличением доли насыщенных жирных кислот до 47%. Наибольшее содержание омега-3 жирных кислот (37,8%) наблюдалось во время экспоненциального роста.

Для биотехнологического использования биомасса водорослей должна иметь сбалансированный состав жирных кислот. Для сельскохозяйственного применения важно соотношение омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот. Прежде всего, биомасса должна иметь низкие концентрации омега-6 жирных кислот в сочетании с высоким содержанием омега-3. Различными значениями этого соотношения характеризуются представители Nostocaceae: штаммы *Anabaenopsis* V.V. Miller (преобладание омега-3 над омега-6 в 3–3,2 раза), *Aphanizomenon* Morren ex Bornet et Flahault (в 2,4–8 раз), *Cylindrospermum* F.T. Kützing ex É. Bornet et C. Flahault (в 0,9–10,9 раз), *Desmonostoc* (в 2–4,6 раза), *Nodularia* Mertens ex Bornet et Flahault (в 0,9–1,2 раза), *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault (в 0,1–12,8 раз) и *Trichormus* (Ralfs ex Bornet et Flahault) Komárek et Anagnostidis (в 1–11,5 раз) (A5). У исследованного штамма *A. vietnamicum* VP225 концентрация омега-3 жирных кислот была больше содержания омега-6 в 2,5–3,1 раз, что приближает его к показателям штаммов *Desmonostoc*. Состав жирных кислот штамма VP225 на экспоненциальной фазе отличался большим процентом полиненасыщенных жирных кислот с значительным преобладанием омега-3, что определяет штамм VP225 в качестве потенциального источника биомассы для сельского хозяйства и аквакультуры. С другой стороны, переход культуры на стационарную фазу способствовал максимальному содержанию насыщенных и мононенасыщенных кислот в биомассе, что делает биомассу штамма VP225 пригодной для производства биодизеля (Knothe, 2014).

### **3.2. Влияние интенсивности освещения и спектрального состава на накопление жирных кислот и пигментов**

Одним из основных факторов, определяющих автотрофный рост микроводорослей, является свет. Продолжая работу по систематизации информации относительно имеющихся зависимостей между условиями культивирования и накоплением водорослями ценных биологических соединений, был сделан анализ влияния условий освещения на рост микроводорослей, содержание липидов, каротиноидов и состав жирных кислот с учетом таких параметров, как интенсивность и продолжительность освещения, а также использование лучей разного спектрального состава (A2).

Водоросли, выращенные при различной интенсивности света, демонстрируют изменения в скорости накопления биомассы, содержании пигментов, липидов, составе и соотношении жирных кислот. В целом исследователями используется достаточно

широкий диапазон интенсивности освещения: от 5 до 3500 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с (Sforza et al., 2014; Wu et al., 2020; Virtanen et al., 2021). Однако в ходе работы удалось установить, что интенсивность освещения, оптимальная для роста микроводорослей, как правило, лежит в достаточно узком диапазоне: 26–400 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с. Только некоторые виды демонстрируют чрезвычайно высокую адаптацию к высоким уровням освещения (до 3000–3500 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с) и, соответственно, высокоэффективные механизмы фотозащиты. Увеличение интенсивности освещения приводит к активизации синтеза липидов. Для максимальной продуктивности липидов различные виды и штаммы микроводорослей нуждаются в освещении различной интенсивности: от 60 до 700 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с. Наиболее часто сильный свет сопровождается увеличением содержания триглицеридов. Воздействие света высокой интенсивности стимулирует образование жирных кислот и изменение их состава. Отмечается накопление насыщенных жирных кислот, а также мононенасыщенных и уменьшение количества полиненасыщенных. Однако некоторые микроводоросли в условиях интенсивного освещения могут увеличивать производство арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот. Высокая интенсивность освещения является одним из наиболее эффективных факторов стимуляции синтеза каротиноидов, в том числе, β-каротина, лютеина и астаксантина у микроводорослей. Использование светового потока специального спектрального состава изменяет метаболические процессы в клетках микроводорослей, а также состав соединений, накапливаемых клетками. Красное, а также синее светодиодное освещение улучшает продуктивность биомассы микроводорослей различных таксономических групп. Манипуляции с продолжительностью фотопериода позволяют увеличивать продуктивность микроводорослей за счет повышения эффективности поглощения света.

Установленные закономерности не всегда однозначны применительно к различным таксономическим группам микроводорослей, а иногда и к различным штаммам одного вида. Устранение имеющихся неоднозначностей и противоречий – задача будущих исследований, которые связаны со стандартизацией и унификацией подходов к изучению влияния освещения на рост и продуктивность микроводорослей; выяснением оптимальных условий освещения для культивирования биотехнологически ценных видов и штаммов микроводорослей; определением стимулирующих эффектов сочетания светового стресса с другими видами стрессов на рост и продуктивность микроводорослей с учетом синтеза ценных биопродуктов (липидов, жирных кислот, каротиноидов); конкретизацией диапазонов оптимальных условий освещения для роста микроводорослей различных таксономических, филогенетических и экологических групп. Установленные на данном этапе закономерности, по нашему мнению, целесообразно использовать в качестве исходных при подборе условий освещения в биотехнологических исследованиях микроводорослей (A2).

### **3.3. Скрининг состава пигментов в биомассе микроводорослей и цианобактерий**

В-фикоэритрин, с практической точки зрения, является ценным природным пигментом, биотехнологический потенциал которого используется в нутрицевтике, фармацевтике, пищевой и косметической промышленности, а также в биомедицинских исследованиях и клинической диагностике (Manirafasha et al., 2016). Он входит в состав светособирающего пигментного комплекса красной микроводоросли *Porphyridium*

*purpureum* (Bory) K.M. Drew et R. Ross, а его количество в клетках определяется уровнем облучённости, обеспеченности азотом и углеродом (Gudvilovich et al., 2021; А3). Было установлено, что оптимальный прирост плотности культуры *P. purpureum* (штамм IBSS-70), соответствующий расчетной концентрации азота в питательной среде, соответствует только варианту с освещённостью 5 кЛк. Увеличение освещённости до 10 и 15 кЛк вызывало снижение как максимальной, так и средней продуктивности культуры в 2,5–3,5 раза. Экспериментально установлено, что самое высокое содержание В-фикоэритрина в клетках и культуре *P. purpureum* (5,5% сухого вещества и 74 мг/л соответственно) наблюдается при освещённости 5 кЛк (Gudvilovich et al., 2021).

В целом, уровень освещённости клеток микроводоросли *P. purpureum* оказывает значительное влияние на ростовые характеристики культуры (скорость роста, скорость синтеза и выход В-фикоэритрина): более низкий уровень поверхностной освещённости культуры является предпочтительным для выращивания *P. purpureum*. Предложенный способ освещения во время культивирования *P. purpureum* позволяет снизить материальные затраты с сохранением высокой скорости роста культуры.

Также проанализирован рост *P. purpureum* и продукция В-фикоэритрина в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа при различных способах введения CO<sub>2</sub> в культуру (А3). Известно, что углерод является основным элементом биомассы микроводорослей и входит в состав всех органических соединений (Zhao, Su, 2014). При этом достаточное количество углерода в доступной форме в среде является необходимым условием для протекания в клетках *P. purpureum* фотобиосинтетических процессов с высокой скоростью и интенсификации накопления биомассы (А3). Рассмотрено несколько способов введения газа в культуру *P. purpureum*: 1) непосредственное введение CO<sub>2</sub> в газоздушную смесь (2–3% v/v) и барботирование культуры через капилляр диаметром 4 мм; 2) подача воздуха через распылитель – пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм и диаметром пор 0,1 мм; 3) барботирование воздухом через капилляр без дополнительного введения углекислого газа (Рис. 9). Скорость подачи газа составляла 0,8 л/л культуры в минуту.

Во всех вариантах эксперимента отмечено значительное увеличение продуктивности культуры *P. purpureum* (до 2,5 раз) и скорости синтеза В-фикоэритрина (до 8,5 раз) по сравнению с его выращиванием на воздухе без распыления или барботирования (Рис. 9). Установлено, что самым эффективным способом культивирования *P. purpureum* является барботирование смесью воздуха и CO<sub>2</sub> через капилляр. Этот способ позволил за 16 дней культивирования достичь прироста биомассы 3,0 г/л (в противовес 2,5 и 0,68 г/л в других вариантах эксперимента) и максимальной продуктивности накопления В-фикоэритрина, 12,3 мг/л×сутки (в отличии от 8,5 и -0,5 мг/л×сутки) (А3). В итоге, использование разработанного технологического приёма барботирования позволило интенсифицировать процессы перехода углекислого газа из воздуха в среду, что, в целом, способствовало поддержанию высокой скорости накопления биомассы *P. purpureum* и В-фикоэритрина.

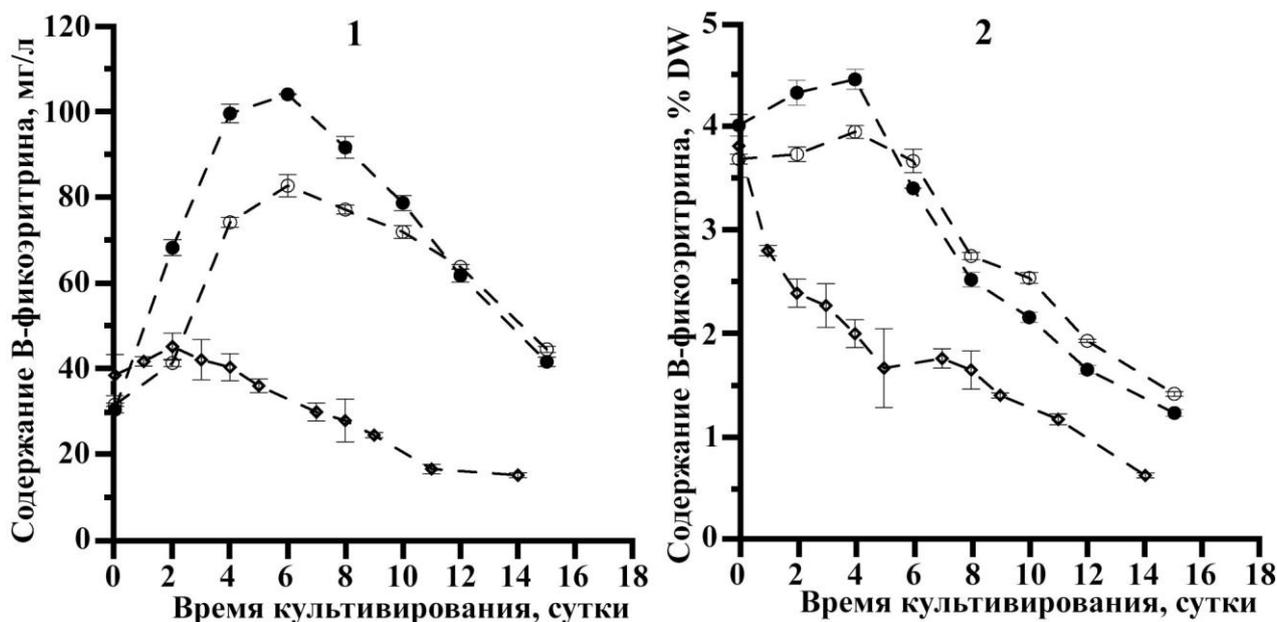


Рисунок 9. Динамика содержания В-фикоэритрина в культуре (1) и биомассе (2) *Porphyridium purpureum* при различных способах внесения углерода в фотобиореактор: ● – барботирование смесью воздуха и CO<sub>2</sub> через капилляр; ○ – распыление воздуха; ◇ – барботирование воздухом через капилляр (A3).

Фукоксантин является одним из самых распространенных каротиноидов в природе (Matsuno, 2001). Это основной каротиноид гетероконтных и гаптофитовых водорослей, насчитывающих более 20 тысяч видов (Andersen, 2004). Фукоксантин также обладает многими полезными для здоровья свойствами, включая противораковые, антигипертензивные, противовоспалительные эффекты, а также способностью снижать риск возникновения ожирения (Martin, 2015). Водоросли являются основным источником фукоксантина для коммерческого производства. Чтобы найти наиболее эффективные штаммы микроводорослей, продуцирующие фукоксантин, мы изучили параметры роста и содержание пигмента у семи новых штаммов диатомовых и золотистых микроводорослей, выделенных из разных мест России и Вьетнама (штаммы *Cyclotella meneghiniana* SBV23, SBV11; *Cyclotella* cf. *cryptica* SBV12, *Nitzschia* sp. SBV25, *Nitzschia* sp. SBV26; *Mallomonas* sp. SBV13, *Paralia longispina* SBV19) (A37). Среди изученных штаммов самым высоким содержанием фукоксантина в биомассе (26,6 мг/г сухой биомассы) характеризовался штамм *Mallomonas* sp. SBV13. Концентрация фукоксантина в биомассе штамма SBV13 превышает уже известные показатели используемых в промышленности штаммов SCCAP K-1251 *Odontella aurita* (Lyngbye) C. Agardh (21,7 мг/г сухой биомассы), *Isochrysis* aff. *Galbana* (18,2 мг/г), *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646 (10,3 мг/г), *Phaeodactylum tricornutum* B-007 (15,7 мг/г).

Также нами был осуществлен поиск оптимальных условий для культивирования *Mallomonas* sp. SBV13 (A37). Максимальное содержание сухой биомассы в культуре (3,8 г/л) наблюдалось при высокой интенсивности освещения (226 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с). Однако наибольшее содержание фукоксантина было зафиксировано при низкой интенсивности света (24 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с). Эксперименты показали, что культура *Mallomonas* sp. SBV13 способна расти в диапазоне температур от 16 до 30°C, при этом наилучший рост наблюдался при 28°C. Оптимальный роста штамма наблюдался при pH 7,6 и концентрации NaCl 0 г/л. Установлено, что культура

*Mallomonas* sp. SBV13 не способна расти при концентрациях NaCl выше 1,5 г/л. Оптимальная концентрация нитратов в питательной среде WC была 5–10 ммоль/л, а фосфатов 0,5–5 ммоль/л. В результате работы показано, что штамм *Mallomonas* sp. SBV13 может быть потенциальным продуцентом фукоксантина, а также подобраны оптимальные условия для его коммерческого культивирования (A37).

Таким образом, разнообразие микроводорослей и цианобактерий составляет природный ресурс получения липидов, ценных жирных кислот, пигментов (В-фикоэритрина и фукоксантина). Биохимический профиль микроводорослей и цианобактерий проявляет определенную специфику в пределах основных филогенетических и экологических групп, изменяется при смене условий освещения и режима азотного и фосфорного питания во время культивирования, что позволяет регулировать процессы накопления соединений в сторону синтеза ценных для практического использования. Характер изменений в накоплении липидов и составе жирных кислот может отличаться у различных штаммов одного вида, а также видов одного рода, что может быть обусловлено различными адаптациями к содержанию питательных веществ или режиму освещения в исходных местообитаниях и метаболическими путями преодоления стрессовых воздействий.

В результате проведения биохимического скрининга среди уникальных штаммов из созданной коллекции культур микроводорослей и цианобактерий биотехнологического назначения для производства биотоплива рекомендовано 8 штаммов диатомовых (*Pinnularia ministomatophora* VP563, *P. vietnamogibba* VP290, VP294, *P. minigibba* VP284, *P. microgibba* VP292, VP289, *P. insolita* VP280, *P. paradubitabilis* VP236), 4 штамма зеленых водорослей (*Bracteacoccus bullatus* MZ–Ch11, *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23, *Nephrochlamys yushanlensis* MZ–Ch62, *Parietochloris grandis* MZ–Ch5) и 1 штамм цианобактерий (*Aliinostoc vietnamicum* VP225). Для повышения продуктивности в животноводстве и аквакультуре при создании кормов и подкормок рекомендовано использовать биомассу 5 штаммов зеленых водорослей (*Bracteacoccus bullatus* MZ–Ch32, *Coccomyxa elongata* MZ–Ch64, *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23, *Parietochloris grandis* MZ–Ch5, *Pseudomuriella engadinensis* MZ–Ch33). Для производства пигментов, которые могут применяться как функциональные ингредиенты или компоненты пищевых добавок, предложено использовать биомассу штамма золотистой микроводоросли *Mallomonas* sp. SBV13 в качестве продуцента фукоксантина и штамма красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* IBSS-70 для получения В-фикоэритрина.

#### **Глава 4. Влияние потенциально токсичных элементов на микроводоросли**

Некоторые химические элементы, относительная молекулярная масса и плотность которых больше 50 и 5 г/см<sup>3</sup> (Koller, Saleh, 2018), относят к группе потенциально токсичных элементов или тяжелым металлам. Среди них есть и те, которые необходимы для метаболизма живых организмов, например, Fe, Cu, Zn и Mn. Их негативный эффект наблюдается только при превышении количества, необходимого для осуществления метаболизма. Также среди тяжелых металлов выделяют высокотоксичные, влияющие негативно на живые организмы даже в минимальных количествах. Это, например, Pb, As, Hg, Cd, Sb, Cr (Odobashić et al., 2019). Содержание таких элементов в природной среде оказывает значительное влияние на жизнеспособность микроводорослей. Отмечаемая на данное время тенденция увеличения содержания тяжелых металлов в природных средах обитания

микроводорослей, актуализирует изучение пределов их толерантности. Это важно для оценки возможности использования микроводорослей при диагностике экологической ситуации в экосистемах, определения токсичности металлов, ремедиации почв, промышленных отвалов, очистки сточных вод и др. Большой практический интерес представляет поиск видов водорослей для технологий ремедиации: сочетание производства биомассы водорослей с удалением металлов является новым альтернативным решением проблем удаления загрязнений и производства биотоплива (Yang et al., 2015).

В связи с этим нами была исследована устойчивость штаммов зеленых водорослей MZ–Ch31 *Bracteacoccus minor* и MZ–Ch212 *Lobosphaera incisa* (Reisigl) Karsten et al., представляющих потенциальный интерес в биотехнологическом отношении (A1), к действию Zn и Mn. Избыточное накопление Zn и Mn в почвах, водных экосистемах сегодня неоднократно отмечалось различными исследователями (Meena et al., 2018; Baraud et al., 2020). В тоже время Zn и Mn необходимы для осуществления метаболических процессов у микроводорослей, но при концентрациях, превышающих следовые значения, оказывают на них токсическое действие (Cameron et al., 2018; Zwolak et al., 2019).

В хроническом тесте использовались различные концентрации Zn и Mn (1, 5, 25, 50, 500, 1000 мг/л) в питательной среде BBM (A16). При определении степени токсичности металлов использовали показатель EC50, который означает гибель 50% организмов под действием токсиканта. Для исследования всех возможных взаимосвязей, возникающих при воздействии Zn и Mn на два разных вида водорослей, был использован метод главных компонент, PCA (Рис. 10).

Результаты исследования показали, что токсическое действие Zn и Mn на *B. minor* и *L. incisa* начинает проявляться при самой низкой из исследованных концентраций металлов – 1 мг/л. Критическая концентрация Zn, приводящая к полной гибели *B. minor* и *L. incisa*, составляет 50 и 500 мг/л, а Mn – 1000 и 500 мг/л соответственно.

Установлено, что главная компонента 1 составляет 60,5% от общей дисперсии и отражает изменения, связанные с низкими концентрациями тяжелых металлов (до 5 мг/л). На главную компоненту 2 приходится 28% общей дисперсии (Рис. 10). Главная компонента 2 в основном связана с высокими концентрациями ионов тяжелых металлов. Влияние концентраций Zn и Mn до 5 мг/л и выше 50 мг/л на *B. minor* и *L. incisa* носит различный характер. В целом *B. minor* более устойчива к марганцу, тогда как *L. incisa* более устойчива к цинку.

Полученные результаты позволяют предположить, что *B. minor* и *L. incisa* представляют интерес для дальнейшего изучения возможностей их использования для биоиндикации, биотестирования, ремедиации, а также, учитывая их способность накапливать липиды в больших количествах, – для культивирования в сточных водах, содержащих тяжелые металлы, и получения биомассы, пригодной для производства биотоплива (A16).

Таким образом, метод главных компонент позволил выявить скрытые факторы, определяющие результат действия разных концентраций тяжелых металлов на *Bracteacoccus minor* и *Lobosphaera incisa*. При концентрациях Zn и Mn до 5 мг/л главная компонента 1 положительно связана с экспериментами с *B. minor*, и отрицательно – с *L. incisa*. При высоких концентрациях (50 и 500 мг/л) главная компонента 2 положительно связана с *B. minor* в наблюдениях с Zn и *L. incisa* с Mn, и отрицательно – с *B. minor* в наблюдениях с Mn и *L. incisa* с Zn. Результаты свидетельствуют, что *B.*

*minor* и *L. incisa* являются чувствительными тест-объектами для установления токсичности тяжелых металлов, демонстрируют специфическую реакцию на Zn и Mn и их различные концентрации.

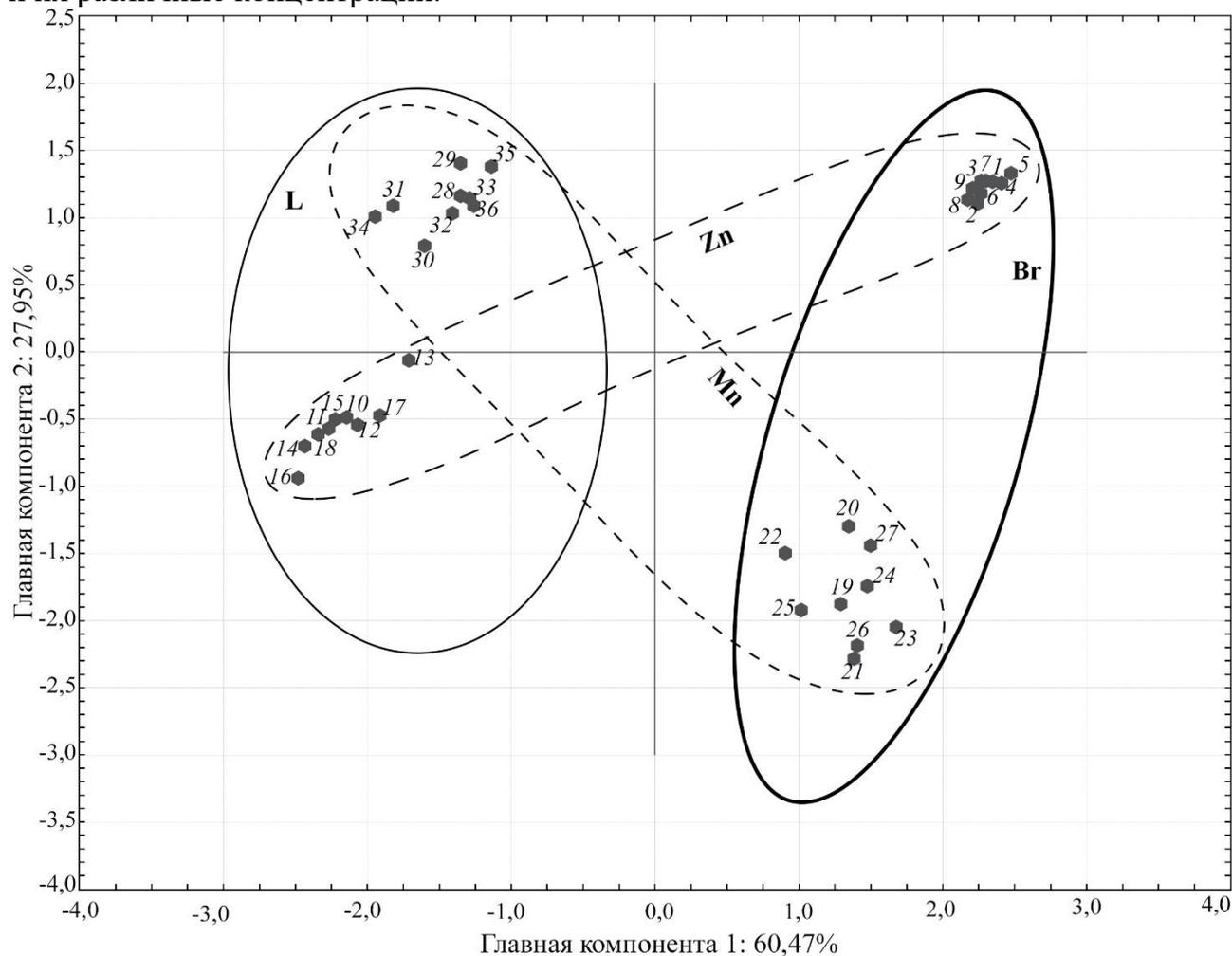


Рисунок 10. Проекция результатов экспериментов на плоскость, образуемую главной компонентой 1 и главной компонентой 2: (1–9) *Bracteacoccus minor* + Zn; (10–18) *Lobosphaera incisa* + Zn; (19–27) *Bracteacoccus minor* + Mn; (28–36) *Lobosphaera incisa* + Mn; (L) кластер *Lobosphaera incisa*; (Br) кластер *Bracteacoccus minor*; (Zn) кластер Zn; (Mn) кластер Mn. Цифрами указаны повторности (A16).

## Глава 5. Микроводоросли промышленных отвалов, почв урбозкосистем и возможность биотехнологического использования организмов

Микроводоросли и цианобактерии – разнообразная группа организмов, адаптированная к существованию в местообитаниях с широким спектром экологических условий. Хорошо известна их способность заселять безжизненные субстраты промышленных отвалов, а также почв, подвергающихся значительной антропогенной нагрузке и характеризующихся неблагоприятными для живых организмов физико-химическими параметрами.

Возрастающее негативное влияние на окружающую среду, здоровье человека и сохранение биоразнообразия вследствие стремительного роста территорий, занятых промышленными отходами, а также с нарушенным почвенным покровом, потребовало неотлагательного поиска решений этой проблемы. Согласно современным данным высокую эффективность в преодолении негативного действия промышленных отвалов

на окружающую среду имеет биологическая рекультивация. Учитывая, что каждый из методов биологической рекультивации имеет те или иные ограничения и недостатки, для достижения максимальной эффективности предлагается комбинировать и сочетать различные подходы, которые улучшают свойства отходов и делают их более пригодными для роста растений. В этом отношении большой интерес представляет разнообразие микроводорослей и цианобактерий, заселяющих поверхность отвалов и инициирующих первичные сукцессии. Изучение колонизации живыми организмами промышленных отвалов имеет важное значение для разработки стратегий по улучшению экологических, социальных и экономических результатов управления отвалами (Cabala et al., 2011; Marques et al., 2017; Wang et al., 2018).

Данные о видовом богатстве промышленных отвалов ценны для понимания биогеографии и экологии видов микроводорослей и цианобактерий, а также выделения перспективных для биотехнологического использования штаммов. Предполагается, что разнообразие метаболических стратегий, связанных со спецификой выживания в экстремальных местообитаниях, может приводить к более высокой продуктивности ценных с биотехнологической позиции соединений. Поиск штаммов экстремофилов может стать одной из новых стратегий в биотехнологическом скрининге микроводорослей и цианобактерий. Такие штаммы могут иметь более ценный состав метаболитов с точки зрения биотехнологии, а их выращивание может быть организовано в условиях, а также на территориях, не пригодных для других организмов и с использованием более дешевых источников питательных веществ, например, сточных вод, содержащих тяжелые металлы и др. поллютанты. Учитывая это, нами было изучено разнообразие микроводорослей и цианобактерий промышленных отвалов и почв урбоэкосистем (Maltsev et al., 2017; Didur et al., 2018a; Didur et al., 2018b; A21; A17; A14; A11).

### **5.1. Микроводоросли и цианобактерии промышленных отвалов**

Большое количество малоисследованных промышленных отвалов находится на территории известняковых месторождений Тульской области, каменноугольного бассейна Западного Донбасса, Никопольского марганцеворудного и Криворожского железорудного бассейнов. Восстановление растительности и почвенного покрова на данных отвалах происходит медленно, что связано в первую очередь с неблагоприятными физико-химическими характеристиками слагающих пород.

Исследования показали, что первыми на данных отвалах появляются виды Cyanophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae. В ходе сукцессии сообщества дополняются видами из Klebsormidiophyceae, Eustigmatophyceae, Xanthophyceae, Bacillariophyceae. Среди видов, отмеченных на отвалах, многие представляют интерес для последующих биотехнологических исследований. Это прежде всего виды *Bracteacoccus*, *Chlorococcum Meneghini*, *Coelastrella*, *Mychonastes* P.D. Simpson et S.D. Van Valkenburg (Chlorophyceae), *Chlorella* Beyerinck [Beijerinck], *Myrmecia* Printz (Trebouxiophyceae), *Vischeria* Pascher (Eustigmatophyceae) и другие (Didur et al., 2018b; A21; A14; A11).

Развитие сообществ водорослей на хвостохранилищах и различных отвалах способствует накоплению органического вещества, уменьшению эрозионных процессов, что создает более благоприятные условия для развития других организмов и восстановлению разрушенных экосистем (Gypser et al., 2016; A21).

При описании первичных сукцессий, выделении стадий зарастания отвалов, помимо высших растений (Dhar et al., 2020) обращают внимание и на развитие

биологических почвенных корок (Cabala et al., 2011; Gypser et al., 2016; Marques et al., 2017; Wang et al., 2018; Nyenda et al., 2019). Биологические почвенные корочки состоят из цианобактерий, водорослей, микроскопических грибов, лишайников и мхов в разных пропорциях (Belnap et al., 2001). Ход сукцессии на промышленных отвалах идет следующим образом: голый субстрат, водорослевая корка, смешанная моховая и водорослевая корка, вегетационная стадия (Song et al., 2014). В этом случае водорослевая корка рассматривается как инициальная стадия сукцессии. Однако следует учитывать тот факт, что формирование водорослевой корки также происходит поэтапно.

В ходе проведенного анализа первичных сукцессий на различных отвалах и на основании подходов Тарчевского, Штины (1967) к выделению этапов сукцессии и Komáromy (1976) к типам роста нами было выделено пять стадий формирования сообществ микроводорослей и цианобактерий: дисперсный аэрофитон, слоистый эпилитофитон, водорослевая корка, смешанная мохово-водорослевая корка и эдафон (Рис. 11) (A11). Каждая стадия характеризуется специфическим видовым составом, типом роста микроводорослей и цианобактерий, выделяемым согласно Komáromy (1976).

Сообщество, соответствующее стадии дисперсного аэрофитона, характеризуется нестабильностью, развивается в условиях выраженного давления абиотических факторов. Его формируют виды микроводорослей и цианобактерий, которые характеризуются высокой устойчивостью к инсоляции, нестабильности водного режима, недостатку питательных веществ, наличию фитотоксических соединений и т.п.

Основу сообщества на стадии слоистого эпилитофитона представляют нитчатые цианобактерии, образующие пленочные разрастания. Это сообщество имеет более выраженное влияние на экотоп и с его формированием уменьшаются эрозионные процессы, увеличивается содержание гумуса, активизируются почвообразовательные процессы на отвалах.

Сообщество, приходящее на смену слоистого эпилитофитона, проявляет все более выраженные черты сообществ водорослей, характерных для природных экосистем, окружающих промышленный отвал. Это сообщество представляет стадию водорослевой корки. Видовой состав сообщества этой стадии развития сукцессии обогащается нитчатыми эукариотическими водорослями, цианобактериями, особенно с развитыми слизистыми структурами. Именно на стадии слоистого эпилитофитона из субстрата отвала известнякового месторождения был выделен штамм *Coelastrella multistriata* MZ–Ch23, показавший способность продуцировать большое количество биомассы с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (A14).

Стадия смешанной мохово-водорослевой корки характеризуется активным развитием мхов. Сообщество цианобактерий и водорослей, развитие которого подчинено в первую очередь эдификаторному влиянию высших растений, соответствует эдафону. Это сообщество во времени совпадает с вегетационной стадией, т.е. стадией активного развития высших растений на отвалах.

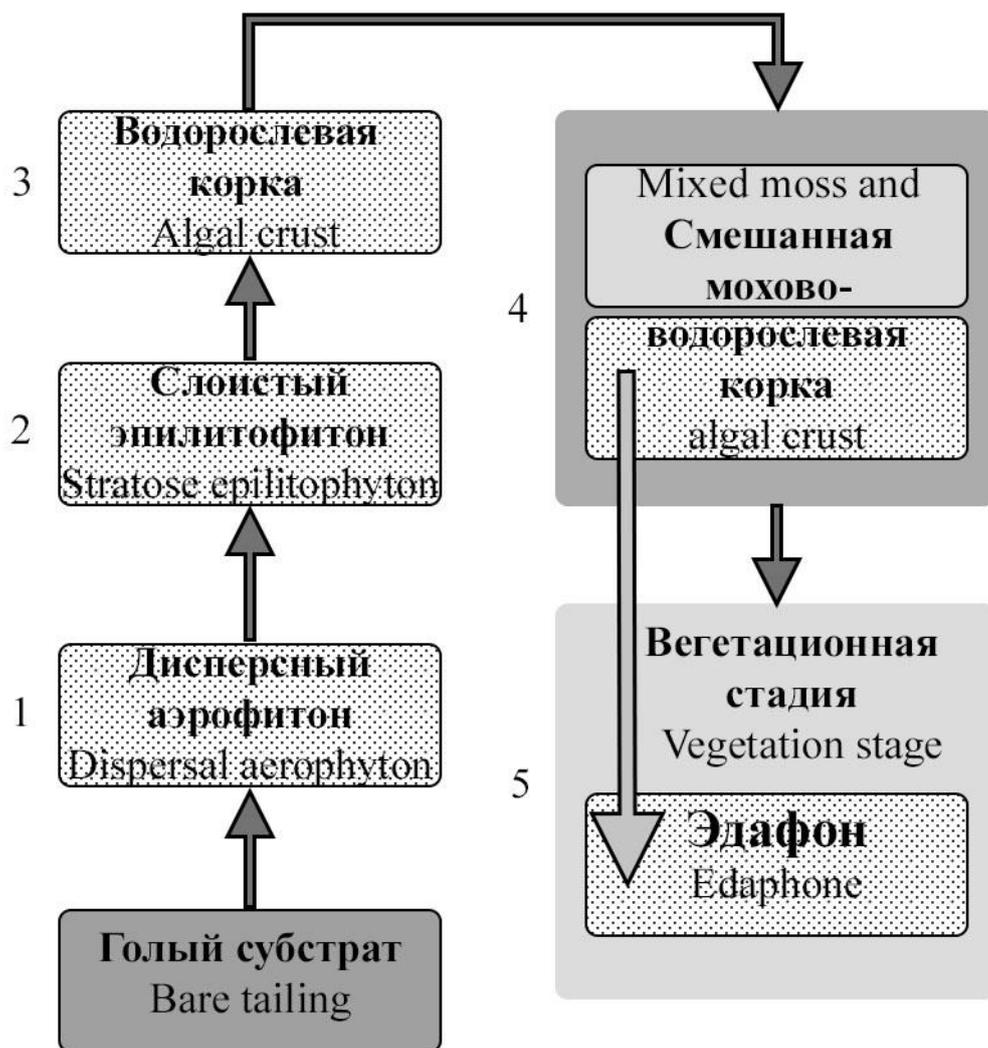


Рисунок 11. Обобщенная схема сукцессионных рядов сообществ цианобактерий и водорослей на промышленных отвалах: (1) высшие растения отсутствуют, доминирующую роль в формировании сообщества играют абиотические условия отвала; (2) достаточно устойчивое сообщество на основе нитчатых цианобактерий, образующих пленочные наросты, сообщества имеют большое значение для первичного почвообразования; (3) водорослевые корки, состоящие из различных цианобактерий и водорослей; (4) водорослевые корки, состоящие из различных цианобактерий, водорослей, лишайников и мхов; (5) сообщество цианобактерий и водорослей на отвалах, развитие которых подвержено эдификаторному влиянию высших растений, эдафон (A11).

Количество и разнообразие видов микроводорослей и цианобактерий, динамика развития их сообществ, как показывают наши и другие исследования, зависят от физико-химических характеристик субстратов отвалов, таких как содержание элементов питания, наличие токсических элементов, pH, гранулометрический и минералогический состав пород и др. (Trecińska, Pawlik-Skowrońska, 2008; Song et al., 2014; A11). Поэтому особое значение имеет определение характера действия как отдельных физико-химических свойств субстратов отвалов, так и их совместное влияние на сообщества микроводорослей и цианобактерий. Для

выявления зависимости динамики структуры сообществ микроводорослей и цианобактерий от минералогического состава техногенных субстратов, условий засоления, pH, содержания частиц физической глины и гумуса была использована процедура ординации по методу неметрического многомерного шкалирования (NMDS) (A11). В результате были выделены четыре NMDS измерения, которые могут быть объяснены с помощью переменных среды. Измерение NMDS 1 представляло изменчивость структуры сообществ микроводорослей и цианобактерий в градиенте условий засоления и кислотности водного раствора эдафотопа (Рис. 12). Также это измерение было чувствительно к изменчивости минералогического состава субстратов отвала. Измерение NMDS 2 преимущественно характеризовало результаты динамики сообществ, обусловленные различным содержанием в эдафотопах органического вещества и частиц физической глины. Измерения NMDS 3 и 4 характеризовали преимущественно временной аспект динамики сообщества.

Диагностически значимыми признаками сообществ микроводорослей и цианобактерий согласно физико-химическим параметрам техногенных субстратов являются: увеличение видового богатства цианобактерий при увеличении содержания частиц физической глины в субстратах и смещении pH в щелочную сторону, увеличение общего разнообразия видов при увеличении содержания гумуса.

На основе значений измерений NMDS 1 и 2 был выполнен кластерный анализ видов микроводорослей и цианобактерий, в результате чего установлены 4 группы видов с различным отношением к исследованным переменным. Три группы видов (А, С и В, Рис. 12) были дифференцированы в диапазоне наиболее существенного градиента свойств среды, который задается режимом засоления, pH и сопутствующими особенностями минералогической структуры. Различия между кластерами С и В состоят в степени эвритопности видов. Кластер В является более экологически-гетерогенным и в свой состав включает более эвритопные виды, способные существовать в условиях умеренного засоления. Кластер С является экологически-гомогенным, состоящим из стенотопных видов, которые исключают возможность жизни в условиях засоления. Кластер D объединяет виды, которые требовательны к относительно высокому уровню органического вещества и физической глины в эдафотопе.

Данные о составе видов экстремальных местообитаний, их дифференциация по основным физико-химическим градиентам среды важны с точки зрения выбора штаммов для дальнейшего исследования в рамках биотехнологического скрининга.

## **5.2. Микроводоросли и цианобактерии урбоэкосистем**

Микроводоросли и цианобактерии, населяющие почвы городских территорий, испытывают на себе мощное влияние урбанизации вследствие нарушения физико-химических свойств почвы. При изучении микроводорослей и цианобактерий почв г. Геническ (Херсонская область) установлено, что их видовое разнообразие в сравнении с природными эталонными территориями обеднено и характеризуется изменением соотношения ряда таксономических групп (Maltsev et al., 2017). Наиболее разнообразны виды зеленых микроводорослей и цианобактерий, а желтозеленые, эустигматофитовые и диатомовые микроводоросли представлены единичными видами. Более богатый видовой состав микроводорослей и цианобактерий на территории Геническа отмечается в ландшафтно-рекреационной, селитебной и транспортной зонах в сравнении с промышленной зоной и зоной специального использования.

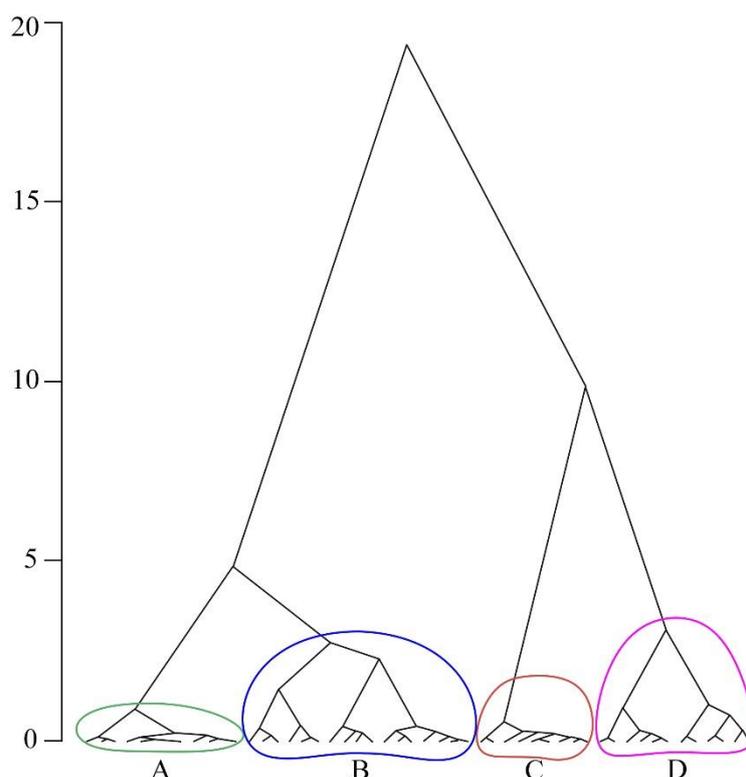


Рисунок 12. Размещение видов в пространстве NMDS-измерений 1 и 2 и градиенты факторов среды. Кластерный анализ видов цианобактерий и водорослей в сообществах по координатам в пространстве NMDS-измерений 1 и 2. Кластер А – *Jaaginema pseudogeminatum* (G. Schmid) Anagnostidis et Komárek, *Kamptonema laetevirens* (H.M. Crouan et P.L. Crouan ex Gomont) Strunecký, Komárek et J. Smarda, *Leptolyngbya fragilis* (Gomont) Anagnostidis et Komárek, *Nodularia harveyana* Thuret ex Bornet et Flahault, *Nostoc microscopicum* Carmichael ex Bornet et Flahault, *Nostoc paludosum* Kützing ex Bornet et Flahault, *Phormidium bohneri* Schmidle, *Phormidium retzii* Kützing ex Gomont, *Bracteacoccus giganteus* H.W. Bischoff et Bold, *Bracteacoccus* sp., *Mychonastes homosphaera* (Skuja) Kalina et Puncochárová, *Myrmecia biatorellae* J.B. Petersen; кластер В – *Leptolyngbya foveolarum* (Gomont) Anagnostidis et Komárek, *Microcoleus autumnalis* (Gomont) Strunecky, Komárek et J.R. Johansen, *Phormidium breve* (Kützing ex Gomont) Anagnostidis et Komárek, *Phormidium corium* Gomont, *Phormidium dimorphum* Lemmermann, *Phormidium inundatum* Kützing ex Gomont, *Phormidium paulsenianum* J.B. Petersen, *Vischeria magna* (J.B. Petersen) Kryvenda, Rybalka, Wolf et Friedl, *Bumilleriopsis* sp., *Luticola mutica* (Kützing) D.G. Mann, *Luticola ventricose* (Kützing) D.G. Mann, *Navicula cryptocephala* Kützing, *Bracteacoccus minor*, *Chlorosarcinopsis caeca* Shin Watanabe, *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová et Eliás, *Floydiella terrestris* (R.D. Groover et A.M. Hofstetter) Friedl et O'Kelly, *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) P.C. Silva, Mattox et W.H. Blackwell; кластер С – *Leptolyngbya frigida* (F.E. Fritsch) Anagnostidis et Komárek, *Vischeria helvetica* (Vischer et Pascher) D.J. Hibberd, *Botrydiopsis arhiza* Borzì, *Adlafia minuscula* (Grunow) Lange-Bertalot, *Fistulifera pelliculosa*, *Chlamydomonas* sp., *Chlorococcum infusionum* (Schrank) Meneghini, *Chlorococcum hypnosporum* Starr, *Spongiochloris excentrica* R.C. Starr, *Tetracystis* sp., *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Myrmecia bisecta* Reisingl; кластер D – *Microcoleus vaginatus* Gomont, *Chlorobotrys gloeothece* Pascher, *Xanthonema exile* (Klebs) P.C. Silva, *Diatoma vulgaris* Bory, *Encyonema minutum* (Hilse) D.G. Mann, *Hantzschia amphioxys*, *Luticola nivalis* (Ehrenberg) D.G. Mann, *Pinnularia appendiculata* (C. Agardh) Schaarschmidt, *Stichococcus bacillaris* Nägeli.

Степень урбаногенной трансформации почвенной биоты и непосредственно сообществ почвенных микроводорослей и цианобактерий может быть выражена через коэффициент, который отражает процент сохранности видового богатства на той или иной городской территории относительно фоновых показателей видового богатства. Еще одним показателем, который может быть использован при биоиндикации городских почв, является возрастание разнообразия видов цианобактерий и зеленых микроводорослей, характеризующихся высокой адаптивной способностью к различным неблагоприятным факторам, наблюдающимся в пределах урбоэкосистем. Высокая адаптивная способность микроводорослей и цианобактерий может быть ценным качеством с точки зрения быстрой адаптации к лабораторным или промышленным условиям их культивирования. В составе сообществ микроводорослей и цианобактерий почв Геническа отмечены виды, которые известны своей способностью к синтезу ценных для биотехнологических производств соединений, это, например, виды *Bracteacoccus*, *Chlorococcum* (Chlorophyceae), *Vischeria* (Eustigmatophyceae) и *Botrydiopsis* Borzi (Xanthophyceae). В то же время почвы урбоэкосистем характеризуются скрытым разнообразием микроводорослей, в том числе псевдокриптических таксонов. Так в почвах на территории Геническа нами отмечены популяции диатомовой водоросли *Hantzschia abundans* и одновременно описан псевдокриптический вид *Hantzschia parva* (A17).

Таким образом, на примере техногенных экотопов месторождения известняка, каменноугольного, марганцеворудного и железорудного бассейнов установлено, что основными факторами, влияющими на видовой состав и структуру сообществ водорослей и цианобактерий промышленных отвалов, являются рН и содержание частиц физической глины, в меньшей степени – минералогический состав субстрата, засоление и количество гумуса. При этом увеличение содержания в субстрате физической глины и смещение рН в щелочную сторону положительно влияет на разнообразие и развитие цианобактерий. Накопление гумуса на отвалах способствует росту видового богатства желтозеленых и зеленых водорослей. Опираясь на специфику роста и видового состава при описании первичных сукцессий, предложено выделять следующие стадии развития сообществ водорослей и цианобактерий: дисперсный аэрофитон, слоистый эпилитофитон, водорослевая корка, смешанная мохово-водорослевая корка и эдафон. Результаты, полученные при изучении микроводорослей и цианобактерий промышленных отвалов и городских почв, имеют ценность не только для изучения разнообразия микроводорослей и цианобактерий экстремальных местообитаний, их экологических особенностей, биогеографии, но и позволяют развить необходимое направление в биотехнологическом скрининге микроводорослей и цианобактерий, связанное с поиском и изучением штаммов экстремофилов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше результаты отражают разработку единого подхода для поиска штаммов микроводорослей и цианобактерий с биотехнологическим потенциалом, включающего описание новых для науки видов с выделением моноклональных штаммов, их морфологическое, молекулярно-генетическое изучение и биохимический скрининг с последующим возможным получением биомассы для прикладных целей. Применение данного подхода позволило проанализировать криптическое разнообразие отдельных таксонов микроводорослей в различных экосистемах Евразии, выделить ключевые диакритические признаки для некоторых

групп микроорганизмов, пополнить референсные базы ДНК-штрихкодов, изучить особенности накопления липидов, жирных кислот, пигментов в биомассе микроводорослей и цианобактерий, в том числе в условиях стрессирования, и в итоге создать коллекцию культур микроводорослей и цианобактерий биотехнологического назначения. Полученные результаты играют первостепенную роль в разработке приемов биоремедиации водоемов и нарушенных наземных экосистем, поиске уникальных продуцентов и изучении их биологических особенностей для использования в биотехнологических целях.

### Выводы

1. Комплексное использование молекулярных и морфологических методов при изучении разнотипных экосистем Евразии позволило описать 2 новых для науки рода (*Gogorevia* и *Dorofeyukea*) и 34 новых для науки вида Bacillariophyceae, 1 новый вид Chlorophyceae, 1 новый вид Trebouxiophyceae и 3 новых вида Cyanophyceae. При этом осуществлена переоценка диакритических признаков в систематике. Важными признаками у пеннатных диатомовых являются строение порового аппарата и структура шва, у зеленых водорослей из Trebouxiophyceae – положение сократительных вакуолей у зооспор, у гетероцитных цианобактерий – наличие зернистых полифосфатных включений в цитоплазме, способность образовывать газовые вакуоли на разных этапах жизненного цикла.

2. Выявлено криптическое разнообразие среди космополитичных видов *Hantzschia amphioxys sensu lato* и *Stephanocyclus meneghiniana sensu lato*. Показано, что это комплексы видов, которые включают как широко распространенные таксоны, так и виды с ограниченным распространением. Морфологически схожие, но генетически различные виды были выявлены среди представителей родов *Placoneis*, *Cymbella* и *Pinnularia*.

3. Продемонстрировано преимущество использования объединенных нуклеотидных последовательностей спиралей D1–D1', Vох–V и V3 для создания матрицы расчета процентного сходства (*p*-расстояния) в качестве одного из критериев для таксономической идентификации цианобактерий. Исключение из анализа гетерогенных спейсеров, расположенных между спиральями D1–D1', Vох–V и V3, позволяет унифицировать метод расчета *p*-расстояния и стандартизировать используемый таксономически значимый межвидовой и внутривидовой диапазон *p*-расстояния ITS у цианобактерий.

4. Общее, установленное на данное время, разнообразие жирных кислот в биомассе микроводорослей и цианобактерий составляет 135. С учетом длины углеводородной цепи, ее структуры и наличия заместителей они распределяются на несколько групп: с четным числом атомов углерода в цепи – 81, с нечетным числом атомов углерода – 33, с разветвленной углеводородной цепью и дополнительными функциональными группами – 21. Среди жирных кислот микроводорослей есть насыщенные – 19, мононенасыщенные – 26 и полиненасыщенные – 68. Показано, что профиль жирных кислот микроводорослей и цианобактерий богат омега-3 и омега-6 жирными кислотами.

5. Оптимальная интенсивность освещения для роста микроводорослей находится в диапазоне 26–400 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с. Увеличение интенсивности освещения приводит к активизации синтеза липидов. Для максимальной продуктивности липидов отдельные виды и штаммы микроводорослей нуждаются в освещении до 700 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>×с. При этом воздействие света высокой интенсивности стимулирует накопление насыщенных и мононенасыщенных жирных

кислот с одновременным уменьшением количества полиненасыщенных. Некоторые микроводоросли в условиях интенсивного освещения увеличивают продуцирование ценных арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой жирных кислот. Красное и синее светодиодное освещение улучшает продуктивность биомассы представителей большинства таксономических групп микроводорослей.

6. На примере промышленных отвалов месторождения известняка, каменноугольного, марганцеворудного и железорудного бассейнов установлено, что основными факторами, влияющими на видовой состав и структуру сообществ водорослей и цианобактерий, являются рН и содержание частиц физической глины, в меньшей степени – минералогический состав субстрата, засоление и количество гумуса. На основании специфичности видового состава сообществ при описании первичных сукцессий промышленных отвалов предложено выделять стадии дисперсного аэрофитона, слоистого эпилитофитона, водорослевой корки, смешанной мохово-водорослевой корки и эдафона. При этом промышленные отвалы могут быть источником биотехнологически-ценных штаммов зеленых микроводорослей из рода *Coelastrella*, способных накапливать достаточное количество биомассы с высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (до 67% от общего количества), в том числе омега-3 (до 58%).

7. Изучение токсического действия Zn и Mn на микроводоросли показало разную устойчивость отдельных видов зеленых водорослей к тяжелым металлам. Штамм *Bracteacoccus minor* продемонстрировал большую устойчивость к марганцу, а штамм *Lobosphaera incisa* – к цинку, что является основой для использования этих организмов в мониторинге и ремедиации экосистем.

8. Рекомендовано 8 штаммов диатомовых, 4 штамма зеленых микроводорослей и 1 штамм цианобактерий для производства биотоплива, 5 штаммов зеленых – для создания сельскохозяйственных кормов и подкормок, 1 штамм золотистых – для получения фукоксантина и 1 штамм красных микроводорослей – для производства В-фикоэритрина.

### Список литературы

1. Андреева, С. Молекулярно-генетическое исследование диатомовых водорослей из родов *Diadlesmis* и *Humidophila* (Bacillariophyceae) / С. Андреева, М. Куликовский, Е. Мальцев, Ю. Подунай, Е. Гусев // Ботанический журнал. – 2016. – Т. 101, № 6. – С. 621–628.
2. Бельгард, А. Л. Степное лесоведение / А. Л. Бельгард. – Москва: Лесная промышленность, 1971. – 336 с.
3. Голлербах, М. М. Почвенные водоросли / М. М. Голлербах, Э. А. Штина. – Ленинград: Наука, 1969. – 228 с.
4. Куликовский, М. С. Определитель диатомовых водорослей России / М. С. Куликовский, А. М. Глущенко, И. В. Кузнецова, С. И. Генкал. – Ярославль: Филигрань, 2016. – 803 с.
5. Полякова, С. Л. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей / С. Л. Полякова, О. И. Давидович, Ю. А. Подунай, Н. А. Давидович // Морской биологический журнал. – 2018. – Т. 3, № 2. – С. 73–80.
6. Скабичевский, А. П. Новый род диатомовых водорослей *Stephanocyclus* Skabitsch. gen. nov. / А. П. Скабичевский // Украинский ботанический журнал. – 1975. – Т. 32, № 2. – С. 268–271.

7. Тарчевский, В. В. Развитие водорослей на промышленных отвалах / В. В. Тарчевский, Э. А. Штина // Современное состояние и перспективы изучения почвенных водорослей в СССР: труды межвузовской конференции. – Киров, 1967. – С. 146–150.
8. Тренкеншу, Р. П. Плотные культуры морских микроводорослей / Р. П. Тренкеншу, И. А. Терсков, Ф. Я. Сидько // Известия Сибирского отделения АН СССР. Серия биологических наук. – 1981. – Т. 5, № 1. – С. 75–82.
9. Abe, K. Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrrella striolata* var. *multistriata* / K. Abe, H. Hattori, M. Hirano // Food Chemistry. – 2007. – V. 100. – P. 656–661.
10. Andersen, R. A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae / R. A. Andersen // American Journal of Botany. – 2004. – V. 91, № 10. – P. 1508–1522.
11. Arao, T. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum* / T. Arao, M. Yamada // Phytochemistry. – 1994. – V. 35, № 5. – P. 1177–1181.
12. Baraud, F. New approach for determination of Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn in sewage sludges, fired brick, and sediments using two analytical methods by microwave-induced plasma optical spectrometry and induced coupled plasma optical spectrometry / F. Baraud, A. Zaiter, S. Porée, L. Leleyter // SN Applied Sciences. – 2020. – V. 2. – P. 1536.
13. Barkia, I. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition / I. Barkia, N. Saari, S. R. Manning // Marine Drugs. – 2019. – V. 17, № 5. – P. 304.
14. Belnap, J. Biological soil crusts: characteristics and distribution / J. Belnap, B. Büdel, O. L. Lange // Biological soil crusts: structure, function, and management. Ecological studies (Analysis and synthesis) // Eds. J. Belnap, O. L. Lange. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. – P. 3–30.
15. Bermejo, E. Production of lutein, and polyunsaturated fatty acids by the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis* under abiotic stress by salt or ultraviolet light / E. Bermejo, M. C. Ruiz-Domínguez, M. Cuaresma, I. Vaquero, A. Ramos-Merchante, J. M. Vega, C. Vílchez, I. Garbayo // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2018. – V. 125. – P. 669–675.
16. Bischoff, H. W. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species / H. W. Bischoff, H. C. Bold // Phycological Studies IV / Eds. H. W. Bischoff, H. C. Bold. – Austin: University of Texas Publication No. 6318, 1963. – 95 p.
17. Bligh, E. G. A rapid method of total lipid extraction and purification / E. G. Bligh, W. J. Dyer // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – V. 37, № 8. – P. 911–917.
18. Borowitzka, M. A. High-value products from microalgae – their development and commercialization / M. A. Borowitzka // Journal of Applied Phycology. – 2013. – V. 25. – P. 743–756.
19. Cabala, J. Soil algal colonization and its ecological role in an environment polluted by past Zn-Pb mining and smelting activity / J. Cabala, O. Rahmonov, M. Jablonska, E. Teper // Water, Air, & Soil Pollution. – 2011. – V. 215. – P. 339–348.
20. Cameron, H. The effect of heavy metals on the viability of *Tetraselmis marina* AC16-MESO and an evaluation of the potential use of this microalga in bioremediation / H. Cameron, M. T. Mata, C. Riquelme // PeerJ. – 2018. – V. 6. – P. e5295.
21. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae / Y. Chisti // Biotechnology Advances. – 2007. – V. 25, № 3. – P. 294–306.

22. Cox, E. J. *Achnanthes* sensu stricto belongs with genera of the Mastogloiales rather than with other monoraphid diatoms (Bacillariophyta) / E. J. Cox // *European Journal of Phycology*. – 2006. – V. 41, № 1. – P. 67–81.
23. Dhar, A. Plant community development following reclamation of oil sands mines using four cover soil types in northern Alberta / A. Dhar, P. G. Comeau, M. A. Naeth, B. D. Pinno, R. Vassov // *Restoration Ecology*. – 2020. – V. 28, № 1. – P. 82–92.
24. Didur, O. A. Ecology of soil algae cenoses in Norway maple plantation in the recultivated territory of the Western Donbas (Ukraine) / O. A. Didur, Yu. L. Kulbachko, Ye. I. Maltsev, T. V. Konovalenko // *Ukrainian Journal of Ecology*. – 2018a. – V. 8, № 1. – P. 865–872.
25. Didur, O. Impact of tropho-metabolic activity of earthworms (Lumbricidae) on distribution of soil algae within *Acer platanoides* L. plantation in recultivated territories of Western Donbass (Ukraine) / O. Didur, Y. Kulbachko, Y. Maltsev // *Ukrainian Journal of Ecology*. – 2018b. – V. 8, № 2. – P. 18–23.
26. Expósito, N. Performance of *Chlorella vulgaris* exposed to heavy metal mixtures: linking measured endpoints and mechanisms / N. Expósito, R. Carafa, V. Kumar, J. Sierra, M. Schuhmacher, G. G. Papiol // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – V. 18, № 3. – P. 1037.
27. Figueroa-Torres, G. M. Microalgal biomass as a biorefinery platform for biobutanol and biodiesel production / G. M. Figueroa-Torres, W. M. A. W. Mahmooda, J. K. Pittmanb, C. Theodoropoulou // *Biochemical Engineering Journal*. – 2019. – V. 153. – P. 107396.
28. Foets, J. Autecology of terrestrial diatoms under anthropic disturbance and across climate zones / J. Foets, J. Stanek-Tarkowska, A. Teuling, B. Van de Vijver, C. Wetzel, L. Pfister // *Ecological Indicators*. – 2021. – V. 122. – P. 107248.
29. Fontaneto, D. Biogeography of microscopic organisms / D. Fontaneto. – Cambridge: Cambridge University Press, 2011. – 384 p.
30. Galloway, A. W. Partitioning the relative importance of phylogeny and environmental conditions on phytoplankton fatty acids / A. W. Galloway, M. Winder // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10, № 6. – P. e0130053.
31. Gudvilovich, I. N. Growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) and production of B-phycoerythrin under varying illumination / I. N. Gudvilovich, A. S. Lelekov, E. I. Maltsev, M. S. Kulikovskii, A. B. Borovkov // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2021. – V. 68, № 1. – P. 188–196.
32. Guijas, C. Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease / C. Guijas, C. Meana, A. M. Astudillo, M. A. Balboa, J. Balsinde // *Cell Chemical Biology*. – 2016. – V. 23, № 6. – P. 689–699.
33. Guillard, R. R. Yellow-green algae with chlorophyllide C1, 2 / R. R. Guillard, C. J. Lorenzen // *Journal of Phycology*. – 1972. – V. 8, № 1. – P. 10–14.
34. Guiry, M. D. *AlgaeBase* [World-Wide Electronic Publication] / M. D. Guiry, G. M. Guiry. – Galway: National University of Ireland, 2022. Available at: <http://www.algaebase.org>
35. Gypser, S. Infiltration and water retention of biological soil crusts on reclaimed soils of former open-cast lignite mining sites in Brandenburg, north-east Germany / S. Gypser, M. Veste, T. Fischer, P. Lange // *Journal of Hydrology and Hydromechanics*. – 2016. – V. 64, № 1. – P. 1–11.

36. Håkansson, H. A compilation and evaluation of species in the general *Stephanodiscus*, *Cyclostephanos* and *Cyclotella* with a new genus in the family Stephanodiscaceae / H. Håkansson // *Diatom Research*. – 2002. – V. 17, № 1. – P. 1–139.
37. Harwood, J. L. Algae: critical sources of very long-chain polyunsaturated fatty acids / J. L. Harwood // *Biomolecules*. – 2019. – V. 9, № 11. – P. 708.
38. Hung, S. L. T. Isolation of microalgae from Kuching, Sarawak, and assessment of their potential for biofuel production and bioremediation of nutrient-rich media: Ph.D. thesis / S. L. T. Hung. – Swinburne University of Technology Sarawak, 2017. – 181 p.
39. Knothe, G. A comprehensive evaluation of the cetane numbers of fatty acid methyl esters / G. Knothe // *Fuel*. – 2014. – V. 119. – P. 6–13.
40. Koller, M. Introductory chapter: introducing heavy metals / M. Koller, H. M. Saleh // *Heavy metals* / Eds. H. Saleh, R. Aglan. – London: IntechOpen, 2018. – 412 p.
41. Komárek, J. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach / J. Komárek, J. Kaštovský, J. Mareš, J. R. Johansen // *Preslia*. – 2014. – V. 86. – P. 295–335.
42. Komáromy, Z. P. Soil algal growth types as edaphic adaptations in Hungarian forest and grass steppe ecosystems / Z. P. Komáromy // *Acta botanica*. – 1976. – V. 22. – P. 373–379.
43. Kotai, J. Instructions for Preparation of Modified Nutrient Solution Z8 for Algae / J. Kotai. – Blindern, Oslo: Norwegian Institute for Water Research, 1972. – 5 p.
44. Lage, S. Microalgae cultivation for the biotransformation of birch wood hydrolysate and dairy effluent / S. Lage, N. P. Kudahettige, L. Ferro, L. Matsakas, C. Funk, U. Rova, F. G. Gentili // *Catalysts*. – 2019. – V. 9, № 2. – P. 150.
45. Lang, I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection / I. Lang, L. Hodac, T. Friedl, I. Feussner // *BMC Plant Biology*. – 2011. – V. 11. – P. 124.
46. Levasseur, W. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification / W. Levasseur, P. Perré, V. Pozzobon // *Biotechnology Advances*. – 2020. – V. 41. – P. 107545.
47. Lever, J. Natural products of marine macroalgae from South Eastern Australia, with emphasis on the Port Phillip bay and heads regions of Victoria / J. Lever, R. Brkljaca, G. Kraft, S. Urban // *Marine Drugs*. – 2020. – V. 18, № 3. – P. 142.
48. Li-Beissona, Y. The lipid biochemistry of eukaryotic algae / Y. Li-Beissona, J. J. Thelen, E. Fedosejevs, J. L. Harwood // *Progress in Lipid Research*. – 2019. – V. 74. – P. 31–68.
49. Maltsev, Y. I. New finding of green algae with potential for algal biotechnology, *Chlorococcum oleofaciens* and its molecular investigation / Y. I. Maltsev, T. V. Konovalenko // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2017. – V. 8, № 4. – P. 532–539.
50. Maltsev, Y. I. Prospects of using algae in biofuel production / Y. I. Maltsev, T. V. Konovalenko, I. A. Barantsova, I. A. Maltseva, K. I. Maltseva // *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. – 2017. – V. 8, № 3. – P. 455–460.
51. Maltsev, Y. I. Use of soil biota in the assessment of the ecological potential of urban soils / Y. I. Maltsev, I. A. Maltseva, A. N. Solonenko, A. G. Bren // *Biosystems Diversity*. – 2017. – V. 25, № 4. – P. 257–262.
52. Maltsev, Y. *Nostoc linckia* (Bornet ex Bornet et Flahault, 1886) (Nostocales: Cyanobacteria) from the Sea of Azov: morphology and molecular investigation of toxigenicity / Y. Maltsev, I. Maltseva, S. Maltseva, M. Kulikovskiy // *Russian Journal of Marine Biology*. – 2020. – V. 46, № 2. – P. 119–128.

53. Maltseva, I. A. Soil algae of the oak groves of the steppe zone of Ukraine / I. A. Maltseva, Y. I. Maltsev, A. N. Solonenko // *International Journal on Algae*. – 2017. – V. 19, № 3. – P. 215–226.
54. Maltseva, S. Y. Functional state of *Coelastrella multistriata* (Sphaeropleales, Chlorophyta) in an enrichment culture / S. Y. Maltseva, M. S. Kulikovskiy, Y. I. Maltsev // *Microbiology*. – 2022. – V. 91. – P. 523–532.
55. Manirafasha, E. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent / E. Manirafasha, T. Ndikubwimana, X. Zeng, Y. Lu, K. Jinget // *Biochemical Engineering Journal*. – 2016. – V. 109. – P. 282.
56. Marella, T. K. Marine diatom *Thalassiosira weissflogii* based biorefinery for co-production of eicosapentaenoic acid and fucoxanthin / T. K. Marella, A. Tiwari // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 307. – P. 123245.
57. Marques, A. R. Biological re-colonization of sub-aerial boundaries of an ‘artificial construction-niche’ contaminated by iron mine tailings: laboratory bioassays / A. R. Marques, F. R. Couto, V. C. Silva, P. V. Fonseca, P. R. P. Paiva, P. P. Pontes, F. C. O. Gomes, A. M. Ferreira // *Environmental Earth Sciences*. – 2017. – V. 76. – P. 480.
58. Martin, L. J. Fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol in cancer prevention and treatment / L. J. Martin // *Marine Drugs*. – 2015. – V. 13, № 8. – P. 4784–4798.
59. Mata, T. M. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review / T. M. Mata, A. A. Martins, N. S. Caetano // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2010. – V. 14, № 1. – P. 217–232.
60. Matsuno, T. Aquatic animal carotenoids / T. Matsuno // *Fisheries Science*. – 2001. – V. 67, № 5. – P. 771–783.
61. McFadden, G. I. Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy / G. I. McFadden, M. Melkonian // *Phycologia*. – 1986. – V. 25, № 4. – P. 551–557.
62. Meena, R. A. A. Heavy metal pollution in immobile and mobile components of lentic ecosystems-a review / R. A. A. Meena, P. Sathishkumar, F. Ameen, A. R. M. Yusoff, F. L. Gu // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2018. – V. 25. – P. 4134–4148.
63. Mikhailyuk, T. I. *Parietochloris ovoideus* sp. nova (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new aerophyte alga from Ukraine / T. I. Mikhailyuk, E. M. Demchenko, S. Y. Kondratyuk // *Algological Studies*. – 2003. – V. 110. – P. 1–16.
64. Minyuk, G. S. pH and CO<sub>2</sub> effects on *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* growth and metabolism / G. S. Minyuk, E. S. Chelebieva, I. N. Chubchikova, N. V. Dantsyuk, I. V. Drobetskaya, E. G. Sakhon, O. B. Chivkunova, K. A. Chekanov, E. S. Lobakova, R. A. Sidorov, A. E. Solovchenko // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2016. – V. 63. – P. 566–574.
65. Minyuk, G. S. Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) in a two-stage culture / G. S. Minyuk, E. S. Chelebieva, I. N. Chubchikova // *International Journal on Algae*. – 2014. – V. 16, № 4. – P. 354–368.
66. Minyuk, G. S. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids / G. S. Minyuk, E. S. Chelebieva, I. N. Chubchikova, N. V. Dantsyuk, I. V. Drobetskaya, E. G. Sakhon, K. A. Chekanov, A. E. Solovchenko // *Algae*. – 2017. – V. 32. – P. 245–259.
67. Moreno, R. R. Identification of naturally isolated Southern Louisiana's algal strains and the effect of higher CO<sub>2</sub> content on fatty acid profiles for biodiesel production / R. R. Moreno, G. M. Aita, L. Madsen, D. L. Gutierrez, S. Yao, B. Hurlburt, S. Brashear // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2013. – V. 88, № 5. – P. 948–957.

68. Nakov, T. Towards a phylogenetic classification of species belonging to the diatom genus *Cyclotella* (Bacillariophyceae): transfer of species formerly placed in *Puncticulata*, *Handmannia*, *Pliocaenicus* and *Cyclotella* to the genus *Lindavia* / T. Nakov, W. Guillory, M. Julius, E. Theriot, A. Alverson // *Phytotaxa*. – 2015. – V. 217, № 3. – P. 249–264.
69. Neofotis, P. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation / P. Neofotis, A. Huang, K. Sury, W. Chang, F. Joseph, A. Gabr, S. Twary, W. Qiu, O. Holguin, J. E. W. Polle // *Algal Research*. – 2016. – V. 15. – P. 164–178.
70. Neustupa, J. I. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga / J. I. Neustupa, M. Elias, P. Skaloud, Y. Nemcova, L. Sejnohova // *Phycologia*. – 2011. – V. 50, № 1. – P. 57–66.
71. Nyenda, T. Occurrence of biological crusts and their relationship with vegetation on a chronosequence of abandoned gold mine tailings / T. Nyenda, W. Gwenzi, T. T. Piyo, S. M. Jacobs // *Ecological Engineering*. – 2019. – V. 139. – P. 105559.
72. Odošić, A. Biosensors for determination of heavy metals in waters, biosensors for environmental monitoring / A. Odošić, I. Šestan, S. Begić // *Biosensors for Environmental Monitoring* / Eds. T. Rinken, K. Kivirand. – London: IntechOpen, 2019. – 204 p.
73. Patova, E. N. Processes of natural soil and vegetation recovery on a worked-out open pit coal mine (Bol'shezemel'skaya tundra) / E. N. Patova, E. E. Kulyugina, S. V. Deneva // *Russian Journal of Ecology*. – 2016. – V. 47, № 3. – P. 228–233.
74. Peltomaa, E. T. Osmotrophic glucose and leucine assimilation and its impact on EPA and DHA content in algae / E. T. Peltomaa, S. Taipale // *PeerJ*. – 2020. – V. 8. – P. e8363.
75. Řezanka, T. Lipidomic analysis of two closely related strains of the microalga *Parietochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) / T. Řezanka, L. Nedbalova, J. Lukavský, L. Procházková, K. Sigler // *Algal Research*. – 2017. – V. 25. – P. 473–482.
76. Rippka, R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria / R. Rippka, J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman, R. Y. Stanier // *Microbiology*. – 1979. – V. 111, № 1. – P. 1–61.
77. Round, F. E. Diatoms: biology and morphology of the genera / F. E. Round, R. M. Crawford, D. G. Mann. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990. – 747 p.
78. Salama, E. S. Algae as a green technology for heavy metals removal from various wastewater / E. S. Salama, H. S. Roh, S. Dev, M. A. Khan, R. A. I. Abou-Shanab, S. W. Chang, B. H. Jeon // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – V. 35. – P. 75.
79. Sathasivam, R. Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine / R. Sathasivam, R. Radhakrishnan, A. Hashem, E. F. Abd Allah // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2019. – V. 26, № 4. – P. 709–722.
80. Sforza, E. Effects of light on cultivation of *Scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor / E. Sforza, B. Gris, C.E. De Farias Silva, T. Morosinotto, A. Bertucco // *Chemical engineering transactions*. – 2014. – V. 38. – P. 211–216.
81. Shaikh, K. M. Molecular profiling of an oleaginous trebouxiophycean alga *Parachlorella kessleri* subjected to nutrient deprivation for enhanced biofuel production / K. M. Shaikh, A. A. Nesamma, M. Z. Abdin, P. P. Jutur // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. – 2019. – V. 12. – P. 182.

82. Song, Y. Characters of soil algae during primary succession on copper mine dumps / Y. Song, W. Shu, A. Wang, W. Liu // *Journal of Soils and Sediments*. – 2014. – V. 14, № 3. – P. 577–583.
83. Sultana, N. Experimental study and parameters optimization of microalgae based heavy metals removal process using a hybrid response surface methodology-crow search algorithm / N. Sultana, S. M. Z. Hossain, M. E. Mohammed, M. F. Irfan, B. Haq, M. O. Faruque, S. A. Razzak, M. M. Hossain // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10. – P. 15068.
84. Sun, X. M. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation / X. M. Sun, L. J. Ren, Q. Y. Zhao, X. J. Ji, H. Huang // *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. – 2018. – V. 11. – P. 272.
85. Trecińska, M. Soil algal communities inhibiting zinc and lead mine spoils / M. Trecińska, B. Pawlik-Skowrońska // *Journal of Applied Phycology*. – 2008. – V. 20. – P. 341–348.
86. Tseplik, N. A new monoraphid diatom species from the genus *Karayevia* sensu lato (Bacillariophyceae: Stauroneidaceae) with remarks on taxonomy and phylogeny of the genus / N. Tseplik, A. Glushchenko, Y. Maltsev, I. Kuznetsova, S. Genkal, J. P. Kociolek, M. Kulikovskiy // *Diatom Research*. – 2022. – V. 37, № 1. – P. 39–50.
87. Virtanen, O. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to extremely strong light / O. Virtanen, S. Khorobrykh, E. Tyystjärvi // *Photosynthesis Research*. – 2021. – V. 147. – P. 91–106.
88. Wang, C. The augmented lipid productivity in an emerging oleaginous model alga *Coccomyxa subellipsoidea* by nitrogen manipulation strategy / C. Wang, Z. Wang, F. Luo, Y. Li // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 33. – P. 160.
89. Wang, D. Soil and vegetation development along a 10-year restoration chronosequence in tailing dams in the Xiaoqinling gold region of Central China / D. Wang, B. Zhang, L. Zhu, Y. Yang, M. Li // *Catena*. – 2018. – V. 167. – P. 250–256.
90. Watanabe, S. Ultrastructure and phylogeny of *Parietochloris toyamaensis* sp. nov. and *P. bilobata* (Trebouxiophyceae) / S. Watanabe, N. Mezaki, T. Nakada // *European Journal of Phycology*. – 2022. – DOI: 10.1080/09670262.2022.2042603
91. Weber, B. Biological soil crusts: an organizing principle in drylands / B. Weber, B. Büdel, J. Belnap. – Cham: Springer, 2016. – 549 p.
92. Wu, M. Effects of different abiotic stresses on carotenoid and fatty acid metabolism in the green microalga *Dunaliella salina* Y6 / M. Wu, R. Zhu, J. Lu, A. Lei, H. Zhu, Z. Hu, J. Wang // *Annals of Microbiology*. – 2020. – V. 70. – P. 48.
93. Xin, Y. Biosynthesis of triacylglycerol molecules with a tailored PUFA profile in industrial microalgae / Y. Xin, C. Shen, Y. She, H. Chen, C. Wang, L. Wei, K. Yoon, D. Han, Q. Hu, J. Xu // *Molecular Plant*. – 2019. – V. 12, № 4. – P. 474–488.
94. Yang, J. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341 / J. Yang, J. Cao, G. Xing, H. Yuan // *Bioresource Technology*. – 2015. – V. 175. – P. 537–544.
95. Zada, S. Microalgal and cyanobacterial strains used for the bio sorption of copper ions from soil and wastewater and their relative study / S. Zada, S. Raza, S. Khan, A. Iqbal, Z. Kai, A. Ahmad, M. Ullah, M. Kakar, P. Fu, H. Dong, Z. Xueji // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2022. – V. 105. – P. 463–472.
96. Zhao, B. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review / B. Zhao, Y. Su // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2014. – V. 31. – P. 121–132.

97. Zwolak, A. Sources of soil pollution by heavy metals and their accumulation in vegetables: a review / A. Zwolak, M. Sarzyńska, E. Szpyrka, K. Stawarczyk // *Water, Air, & Soil Pollution*. – 2019. – V. 230. – P. 164.

### Список научных публикаций, в которых изложены основные научные результаты диссертации

#### Научные обзоры:

A1. **Maltsev, Y.** Fatty acids of microalgae: diversity and applications / **Y. Maltsev, K. Maltseva** // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2021. – V. 20. – P. 515–547. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A2. **Maltsev, Y.** Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids and fatty acid composition / **Y. Maltsev, K. Maltseva, M. Kulikovskiy, S. Maltseva** // *Biology*. – 2021. – V. 10, № 10. – P. 1060. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

#### Научные статьи:

A3. Borovkov, A. B. Growth and B-phycoerythrin production of red microalga *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) under different carbon supply / A. B. Borovkov, I. N. Gudvilovich, I. A. Maltseva, O. A. Rylkova, **Y. I. Maltsev** // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10, № 11. – P. 2124. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q2**

A4. Kezlya, E. A new species of *Placoneis* (Bacillariophyceae: Cymbellales) from wet soils in Southern Vietnam / E. Kezlya, A. Glushchenko, J. P. Kociolek, **Y. Maltsev, S. Genkal, M. Kulikovskiy** // *Cryptogamie, Algologie*. – 2022. – V. 43, № 11. – P. 177–188. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q4**

A5. Maltseva, S. Phylogeny and fatty acid profiles of *Aliinostoc vietnamicum* sp. nov. (Cyanobacteria) from soils of Vietnam / S. Maltseva, E. Kezlya, Z. Krivova, E. Gusev, M. Kulikovskiy, **Y. Maltsev** // *Journal of Phycology*. – 2022. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A6. Kezlya, E. Phylogeny and fatty acid profiles of new *Pinnularia* (Bacillariophyta) species from soils of Vietnam / E. Kezlya, **Y. Maltsev, S. Genkal, Z. Krivova, M. Kulikovskiy** // *Cells*. – 2022. – V. 11, № 15. – P. 2446. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q2**

A7. Kulikovskiy, M. Resurrection of the diatom genus *Stephanocyclus* (Coscinodiscophyceae: Stephanodiscaceae) on the basis of an integrated molecular and morphological approach / M. Kulikovskiy, S. Genkal, **Y. Maltsev, A. Glushchenko, I. Kuznetsova, D. Kapustin, E. Gusev, N. Martynenko, J. P. Kociolek** // *Fottea, Olomouc*. – 2022. – V. 22, № 2. – P. 181–191. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q2**

A8. Glushchenko, A. Description of the soil diatom *Sellaphora terrestris* sp. nov. (Bacillariophyceae, Sellaphoraceae) from Vietnam, with remarks on the phylogeny and taxonomy of *Sellaphora* and systematic position of *Microcostatus* / A. Glushchenko, E. Kezlya, **Y. Maltsev, S. Genkal, J. P. Kociolek, M. Kulikovskiy** // *Plants*. – 2022. – V. 11, № 16. – P. 2148. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A9. Glushchenko, A. M. Molecular and morphological investigations of two giant diatom *Cymbella* species from the Transbaikal area (Russia, Siberia) with comments on their distributions / A. M. Glushchenko, **Y. I. Maltsev, J. P. Kociolek, I. V. Kuznetsova, M. S. Kulikovskiy** // *Plants*. – 2022. – V. 11, № 18. – P. 2445. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

- A10. Maltseva, S. Description of *Desmonostoc caucasicum* sp. nov. (Cyanobacteria) using an integrative taxonomic approach / S. Maltseva, Y. Bachura, T. Erst, M. Kulikovskiy, **Y. Maltsev** // *Phycologia*. – 2022. – V. 61, № 5. – P. 514–527. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q1**
- A11. **Maltsev, Y.** Diversity of cyanobacteria and algae during primary succession in iron ore tailing dumps / **Y. Maltsev**, S. Maltseva, I. Maltseva // *Microbial Ecology*. – 2022. – V. 83. – P. 408–423. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**
- A12. Tseplik, N. D. *Achnantheidium gladius* sp. nov. (Bacillariophyceae) – a new monoraphid diatom species from Indonesia / N. D. Tseplik, **Y. I. Maltsev**, A. M. Glushchenko, I. V. Kuznetsova, S. I. Genkal, E. S. Gusev, M. S. Kulikovskiy // *PhytoKeys*. – 2021. – V. 187. – P. 129–140. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q3**
- A13. Kezlya, E. Three new species of *Placoneis* Mereschkowsky (Bacillariophyceae: Cymbellales) with comments on cryptic diversity in the *P. elginensis*—group / E. Kezlya, A. Glushchenko, **Y. Maltsev**, E. Gusev, S. Genkal, J. P. Kociolek, M. Kulikovskiy // *Water*. – 2021. – V. 13, № 22. – P. 3276. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**
- A14. **Maltsev, Y.** Lipid accumulation by *Coelastrella multistriata* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) during nitrogen and phosphorus starvation / **Y. Maltsev**, Z. Krivova, S. Maltseva, K. Maltseva, E. Gorshkova, M. Kulikovskiy // *Scientific Reports*. – 2021. – V. 11. – P. 19818. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q2**
- A15. Glushchenko, A. *Cymbopleura natellia* – a new species from Transbaikal area (Russia, Siberia) described on the basis of molecular and morphological investigation / A. Glushchenko, E. Gusev, **Y. Maltsev**, J. P. Kociolek, I. Kuznetsova, M. Kulikovskiy // *PhytoKeys*. – 2021. – V. 183. – P. 95–105. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q3**
- A16. **Maltsev, Y.** Differential Zn and Mn sensitivity of microalgae species from genera *Bracteacoccus* and *Lobosphaera* / **Y. Maltsev**, A. Maltseva, S. Maltseva // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – V. 28. – P. 57412–57423. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q2**
- A17. **Maltsev, Y.** Biogeography of the cosmopolitan terrestrial diatom *Hantzschia amphioxys* sensu lato based on molecular and morphological data / **Y. Maltsev**, S. Maltseva, J. P. Kociolek, R. Jahn, M. Kulikovskiy // *Scientific Reports*. – 2021. – V. 11. – P. 4266. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q2**
- A18. **Maltsev, Y.** A new species of freshwater algae *Nephrochlamys yushanlensis* sp. nov. (Selenastraceae, Sphaeropleales) and its lipid accumulation during nitrogen and phosphorus starvation / **Y. Maltsev**, I. Maltseva, S. Maltseva, J. P. Kociolek, M. Kulikovskiy // *Journal of Phycology*. – 2021. – V. 57, № 2. – P. 606–618. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**
- A19. **Maltsev, Y.** A new species of the previously monotypic genus *Iningainema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae) from the Western Ghats, India / **Y. Maltsev**, E. Kezlya, S. Maltseva, B. Karthick, P. Dvořák, J. P. Kociolek, M. Kulikovskiy // *European Journal of Phycology*. – 2021. – V. 56, № 3. – P. 348–358. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q2**
- A20. Tseplik, N. D. *Achnantheidium tineae* sp. nov. – a new monoraphid diatom (Bacillariophyceae) species, described on the basis of molecular and morphological approaches / N. D. Tseplik, **Y. I. Maltsev**, A. M. Glushchenko, I. V. Kuznetsova, S. I. Genkal, J. P. Kociolek, M. S. Kulikovskiy // *PhytoKeys*. – 2021. – V. 174. – P. 147–163. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q3**
- A21. Maltseva, I. A. Diversity of cyanobacteria and algae in dependence to forest-forming tree species and properties rocks of dump / I. A. Maltseva, **Y. I. Maltsev** //

International Journal of Environmental Science and Technology. – 2021. – V. 18. – P. 545–560. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: Q3

A22. Kezlya, E. *Mayamaea vietnamica* sp. nov.: a new, terrestrial diatom (Bacillariophyceae) species from Vietnam / E. Kezlya, A. Glushchenko, J. P. Kociolek, **Y. Maltsev**, N. Martynenko, S. Genkal, M. Kulikovskiy // *Algae*. – 2020. – V. 35, № 4. – P. 325–335. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A23. Kulikovskiy, M. *Gogorevia*, a new monoraphid diatom genus for *Achnanthes exigua* and allied taxa (Achnanthidiaceae) described on the basis of an integrated molecular and morphological approach / M. Kulikovskiy, **Y. Maltsev**, A. Glushchenko, I. Kuznetsova, D. Kapustin, E. Gusev, H. Lange-Bertalot, S. Genkal, J. P. Kociolek // *Journal of Phycology*. – 2020. – V. 56, № 6. – P. 1601–1613. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A24. Kezlya, E. *Placoneis cattiensis* sp. nov. – a new, diatom (Bacillariophyceae: Cymbellales) soil species from Cát Tiên National Park (Vietnam) / E. Kezlya, A. Glushchenko, **Y. Maltsev**, E. Gusev, S. Genkal, A. Kuznetsov, J. P. Kociolek, M. Kulikovskiy // *Phytotaxa*. – 2020. – V. 460, № 4. – P. 237–248. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: Q3

A25. Kulikovskiy, M. Preliminary molecular phylogeny of the diatom genus *Nupela* with the description of a new species and consideration of the interrelationships of taxa in the suborder Neidiineae D.G. Mann sensu E.J. Cox / M. Kulikovskiy, **Y. Maltsev**, A. Glushchenko, E. Gusev, D. Kapustin, I. Kuznetsova, L. Frolova, J. P. Kociolek // *Fottea, Olomouc*. – 2020. – V. 20, № 2. – P. 192–204. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q2**

A26. **Maltsev, Y.** Biotechnological potential of a new strain of *Bracteacoccus bullatus* (Sphaeropleales, Chlorophyta) as a promising producer of omega-6 polyunsaturated fatty acids / **Y. Maltsev**, I. Maltseva, S. Maltseva, M. Kulikovskiy // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2020. – V. 67, № 1. – P. 185–193. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: Q3

A27. Kulikovskiy, M. Morphological and molecular investigation of *Gomphonema longissimum* and related taxa from Malili lakes (Indonesia) with comments on diatom evolution in ancient lakes / M. Kulikovskiy, D. Kapustin, A. Glushchenko, S. Sidelev, **Y. Maltsev**, E. Gusev, E. Kezlya, N. Shkurina, I. Kuznetsova, J. P. Kociolek // *European Journal of Phycology*. – 2020. – V. 55, № 2. – P. 147–161. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A28. Rimet, F. Diat.barcode, an open-access curated barcode library for diatoms / F. Rimet, E. Gusev, M. Kahlert, M. G. Kelly, M. Kulikovskiy, **Y. Maltsev**, D. G. Mann, M. Pfannkuchen, R. Trobajo, V. Vasselon, J. Zimmermann, A. Bouchez // *Scientific Reports*. – 2019. – V. 9. – P. 15116. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A29. **Maltsev, Y.** Fatty acid content and profile of the novel strain of *Coccomyxa elongata* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations / **Y. Maltsev**, I. Maltseva, S. Maltseva, J. P. Kociolek, M. Kulikovskiy // *Journal of Phycology*. – 2019. – V. 55, № 5. – P. 1154–1165. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A30. Kulikovskiy, M. Description of a new diatom genus *Dorofeyukea* gen. nov. with remarks on phylogeny of the family Stauroneidaceae / M. Kulikovskiy, **Y. Maltsev**, S. Andreeva, A. Glushchenko, E. Gusev, Y. Podunay, T. V. Ludwig, E. Tusset, J. P. Kociolek // *Journal of Phycology*. – 2019. – V. 55, № 1. – P. 173–185. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A31. Liu, Q. New *Hannaea* Patrick (Fragilariaceae, Bacillariophyta) species from Asia, with comments on the biogeography of the genus / Q. Liu, A. Glushchenko, M. Kulikovskiy,

**Y. Maltsev**, J. P. Kociolek // *Cryptogamie, Algologie*. – 2019. – V. 40, № 5. – P. 41–61. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: Q3

A32. **Maltsev, Y. I.** Analysis of a new strain of *Pseudomuriella engadinensis* (Sphaeropleales, Chlorophyta) for possible use in biotechnology / **Y. I. Maltsev**, I. A. Maltseva, M. S. Kulikovskiy, S. Yu. Maltseva, R. A. Sidorov // *Russian Journal of Plant Physiology*. – 2019. – V. 66, № 4. – P. 609–617. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: **Q2**

A33. **Maltsev, Y.** Description of *Aneumastus mongolotusculus* sp. nov. (Bacillariophyceae, Mastogloiales) from Lake Hovsgol (Mongolia) on the basis of molecular and morphological investigations / **Y. Maltsev**, S. Andreeva, J. Podunay, M. Kulikovskiy // *Nova Hedwigia, Beihefte*. – 2019. – V. 148. – P. 21–33. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: Q3

A34. Mamaeva, A. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in *Bracteacoccus bullatus* cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations / A. Mamaeva, M. Petrushkina, **Y. Maltsev**, E. Gusev, M. Kulikovskiy, A. Filimonova, B. Sorokin, N. Zotko, V. Vinokurov, D. Kopitsyn, D. Petrova, A. Novikov, Z. Namsaraev, D. Kuzmin // *Journal of Applied Phycology*. – 2018. – V. 30, № 4. – P. 2237–2246. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A35. **Maltsev, Ye.** Description of a new species of soil algae, *Parietochloris grandis* sp. nov., and study of its fatty acid profiles under different culturing conditions / **Ye. Maltsev**, E. Gusev, I. Maltseva, M. Kulikovskiy, Z. Namsaraev, M. Petrushkina, A. Filimonova, B. Sorokin, A. Golubeva, G. Butaeva, A. Khrushchev, D. Kuzmin // *Algal Research*. – 2018. – V. 33. – P. 358–368. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A36. Andreeva, S. *Sellaphora balashovae* (Bacillariophyta), a new species from Siberian mountain lake Frolikha (Baikal region), Russia / S. Andreeva, J. P. Kociolek, **E. Maltsev**, N. Dorofeyuk, E. Kezlya, N. Shkurina, I. Kuznetsova, E. Gusev, M. S. Kulikovskiy // *Phytotaxa*. – 2018. – V. 371, № 2. – P. 73–83. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: Q3

A37. Petrushkina, M. Fucoxanthin production by heterokont microalgae / M. Petrushkina, E. Gusev, B. Sorokin, N. Zotko, A. Mamaeva, A. Filimonova, M. Kulikovskiy, **Y. Maltsev**, I. Yampolsky, E. Guglya, V. Vinokurov, Z. Namsaraev, D. Kuzmin // *Algal Research*. – 2017. – V. 24. – P. 387–393. Квартиль Scopus: **Q1**. Квартиль WoS: **Q1**

A38. **Maltsev, Y.** Molecular phylogeny of the diatom genus *Envekadea* (Bacillariophyceae, Naviculales) / **Y. Maltsev**, S. Andreeva, M. S. Kulikovskiy, J. Podunaj, J. P. Kociolek // *Nova Hedwigia, Beihefte*. – 2018. – V. 146. – P. 241–252. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: Q3

A39. **Maltsev, Y. I.** Seasonal changes in the communities of microorganisms and algae in the litters of tree plantations in the Steppe zone / **Y. I. Maltsev**, S. V. Didovich, I. A. Maltseva // *Eurasian Soil Science*. – 2017. – V. 50, № 8. – P. 935–942. Квартиль Scopus: **Q2**. Квартиль WoS: Q4